

**Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin der Universität  
Tübingen**

**Direktor: Professor Dr. Dipl.-Phys. H.-D. Wehner**

**Eingrenzung der Leichenliegezeit mittels  
immunhistochemischer Untersuchung des Glial  
Fibrillary Acidic Protein (GFAP) in Astrocyten**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Anja Steinriede  
aus  
Stuttgart**

**2005**

Dekan: Professor Dr. med. C. D. Claussen  
1. Berichterstatter: Professor Dr. Dipl.-Phys. H.-D. Wehner  
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Eichner

## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	2
2 Material und Methodik	7
2.1 Material - menschliche Asservate	7
2.2 Material – Mäusekadaver	8
2.3 Methodik – Histologie	9
2.4 Methodik – Immunhistochemie	10
2.5 Methodik - Datenaufbereitung und Auswertung	11
3 Ergebnisse	16
3.1 Humanes GFAP	16
3.2 Tierisches GFAP	38
4 Diskussion	42
4.1 Histomorphologie	42
4.2 Immunhistochemische Anfärbarkeit des GFAP	45
4.3 Einflussfaktoren auf die Anfärbarkeit des GFAP	50
4.4 Differenzierung der postmortalen Leichenliegezeit mit seinem Einfluss auf die Anfärbarkeit	56
4.5 Mäusekadaver / Vergleichsreihe mit erfassbaren Umgebungsbedingungen	57
4.6 Immunhistochemische Methoden zur Todeszeitbestimmung	58
5 Zusammenfassung	61
6 Literaturverzeichnis	63
7 Anhang	71
7.1 Abkürzungen	82
8 Danksagung	83
9 Lebenslauf	84

## 1 Einleitung

Eingrenzung der Leichenliegezeit – schon in dem Titel der Arbeit wird das Problemfeld aufgezeigt: eine Bestimmung des Todeszeitpunktes wird immer schwieriger je länger er zurückliegt. Bei Liegezeiten bis zu zwei Tagen haben Gerichtsmediziner einige Untersuchungsmethoden zur Verfügung, die sich als verlässlich und ausreichend genau erwiesen haben. Bei längeren Liegezeiten der Leichen dünne sich die Bestimmungsmethoden schnell aus. Mehr und mehr treten Erfahrung und Schätzungsvermögen der Mediziner bei der Leichenschau in den Vordergrund, wobei der individuelle Verwesungsprozess und Umfeldeinflüsse immer stärker berücksichtigt werden müssen. Faktoren wie Zustand und körperliche Verfassung der Leiche, Todesursache, Körpertemperatur zum Todeszeitpunkt, Krankheiten, Keimbesiedelung, Liegeort, Umgebungstemperatur, Sonneneinstrahlung, Belüftung, Feuchtigkeit und Tierfraß oder Verschleppung bilden individuelle Rahmenbedingungen, die entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der postmortalen Veränderungen ausüben (Micozzi et al. 1986; Willey und Snyder 1989; Mann et al. 1990; Henssge 2002). Da diese oft nicht bekannt oder nachvollziehbar, schwankend, nicht erfassbar und eindeutig gewichtbar sind, sogar zurückgehalten, verfälscht oder geändert werden können, ist für Mediziner nur eine Eingrenzung bei der Liegezeitbestimmung unter Berücksichtigung und bestmöglichem Einbeziehen der bekannten Faktoren möglich. Die Todeszeitbestimmung stellt schon seit langer Zeit eine Herausforderung dar, deshalb hat sich um dieses Themengebiet ein weites Forschungsfeld entwickelt.

Im frühen postmortalen Stadium, im Rahmen von Stunden, werden temperaturgestützte Methoden zur Bestimmung des Todeszeitpunktes eingesetzt: die Rektaltemperatur-Todeszeit-Nomogramm-Methode (Henssge

1988) mit Rechenformeln und Abkühlungskurven (Brinkmann et al. 1976; Knight 1988; Al Alousi et al. 2001) wurden entwickelt. Da gerade die Temperatur eine Variable mit großem Einfluss auf die postmortalen Veränderungen darstellt, bieten sich weitere Methoden mit anderen Ansatzpunkten an: Untersuchung von Totenflecken (Livores) (Hunnius et al. 1973; Kaatsch et al. 1994), der Totenstarre (Rigor mortis) (Forster et al. 1977; Vain et al. 1992), der mechanischen Erregbarkeit der Muskulatur (Henssge 2002), der elektrischen Erregbarkeit von Muskulatur (Madea und Henssge 1988; Madea und Henssge 1990b; Madea 1992), der Rheobase an Skelettmuskulatur (Joachim und Feldmann 1980; Madea und Henssge 1990a), der Refraktärzeit von Nerven (McDowall et al. 1998), von Schweißdrüsen (Cingolani et al. 1994), von Pupillenreaktionen (Klein und Klein 1982), von zellulären Veränderungen der weißen Blutzellen (Babapulle und Jayasundera 1993; Dokgoz et al. 2001), der Kaliumkonzentration der Glaskörperflüssigkeit (Madea et al. 1989; Madea et al. 1990).

Durch die Kombination von Untersuchungsmethoden z. B. bei der Komplexmethode (Henssge et al. 2000) kommt es zu sinnvollen Ergänzungen mit präziseren Ergebnissen bei der Todeszeitbestimmung.

Zur Bestimmung längerer Zeitintervalle sind im folgenden Abschnitt Methoden zusammengetragen. Späte Leichenerscheinungen wie Autolyse, Fäulnis, Verwesung und konservierende Vorgänge werden in diesem Zeitintervall immer häufiger angetroffen, sie können auch Anhaltspunkte bei der Liegezeitschätzung geben (Sticht et al. 1981; Rothschild et al. 1996a; Rothschild et al. 1996b; Pfeiffer et al. 1998; Jachau und Krause 2002). Elektrophoretische Untersuchungen ergaben zeitabhängige Verschiebungen von Fraktionen (Mittmeyer 1979; Mittmeyer und Strebel 1980; Mittmeyer 1980a; Mittmeyer 1980b; Perry, III et al. 1988). Die Enzymaktivität der Laktat- und Malatdehydrogenase (LDH, MDH) in der Leber kann zur Todeszeitbestimmung bis zu über einem Monat herangezogen werden (Gos und Raszeja 1993). Entomologische Untersuchungen sind bei längerer Liegezeit oft noch brauchbar für relativ präzise Ergebnisse bei der Bestimmung des Todeszeitpunktes (Marchenko 2001), auch im Winterhalbjahr (Niess et al. 2001; Henssge 2002).

Zu nennen sind Untersuchungen zur Identifizierung und Entwicklung (Reiter 1984; Grassberger und Reiter 2001), Altersbestimmung der Insekten (Reiter und Hajek 1984) und zu der zeitlich gestaffelten Besiedelungsabfolge verschiedener Arten (Schoenly 1992). Eine jahreszeitliche Einordnung mit Eingrenzung des Sterbeorts und der Zeit lassen Pollen- und Sporenuntersuchungen zu (Van de Voorde und Van Dijck 1982; Szibor et al. 1998; Wittig et al. 2001). Auch Bodenproben und Untersuchungen bei Exhumierungen wurden auf ihre Aussagekraft und den Einfluss bei postmortalen Prozessen untersucht (Weinmann 1928; Althoff 1974; Lotterle et al. 1982; Vass et al. 1992). Dentalamalgame werden nun schon fast seit 100 Jahren eingesetzt und weiterentwickelt. Ihre Analyse lässt Rückschlüsse auf Zeitepochen zu (Reinhardt et al. 2000). Knochenmaterial kann auf radioaktive Isotope untersucht werden (Neis et al. 1999; Swift et al. 2001). Aus den Ergebnissen können Todeszeitpunkte eingegrenzt werden, die Jahrzehnte zurückliegen. Weit längere Liegezeiten sind mit der Radio-Carbon-Methode erfassbar (Taylor et al. 1989; Piotrowska und Goslar 2002). Sie war in aller Munde, als der Fall „Ötzi“ analysiert wurde (Bonani et al. 1994; Prinoth-Fornwagner und Nikolaus 1994). Zeitabhängige Untersuchungen zu Wasserleichen (Reh et al. 1977) wurden separat durchgeführt. Das wässrige Milieu schafft gute Rahmenbedingungen für Fettwachsbildung (Kahana et al. 1999).

Beeindruckend präzise Ergebnisse bei der Todeszeitbestimmung nach langer Liegezeit (3 Wochen) konnten bei magnetresonanzspektroskopischen (MRS) Untersuchungen am Schädel erzielt werden (Ith et al. 2002).

Das glial fibrillary acidic protein (GFAP) ist ein astrocytenspezifisches, dabei jedoch nicht speziesspezifisches Protein. Es wird in die Klasse III der Intermediär Filamente (IF) mit Vimentin und Desmin eingeteilt. Das IF zusammen mit Actin-Filamenten und Mikrotubuli bauen das Zytoskelett von Zellen auf, dessen Aufgabe darin besteht, die Integrität der Zellen und des Gewebes unter Ausbildung von netzwerkartigen Verbindungen zu erhalten und zu stabilisieren. Der Monomeraufbau der IF mit einer zentralen  $\alpha$ -helikalen

Struktur (rod domain) und einer NH<sub>2</sub>- und COOH-terminalen Region ist immer derselbe, wobei die Aminosäuresequenz der Kopf- und Schwanzregion differiert (Dahl und Bignami 1974). Die Monomierzusammensetzung variiert zwischen den verschiedenen Zelltypen - GFAP bildet in Astrocyten (Prochiantz und Mallat 1988) den Hauptbestandteil neben Vimentin – die Monomere lagern sich zu Dimeren, diese entgegengesetzt zu Tetrameren ohne Richtungsorientierung zusammen, so dass Polymerfilamente synthetisiert werden können (Weber und Geisler 1985; Rutka et al. 1997; Aldskogius und Kozlova 1998; Pekny 2001).

Isoliert wurde das Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 50kDa Anfang der 70er Jahre (Eng et al. 2000), es folgte seine Sequenzierung und Analysierung (Brenner 1994; Inagaki et al. 1994), sowie Chromosomlokalisierung (Lalley et al. 1994). Über einen monoklonalen Antikörper konnte gezeigt werden, dass das GFAP des peripheren Nervensystems Unterschiede in antigenen Determinanten zu dem des ZNS aufweist (Jessen et al. 1984). Auch Forschungen über die Veränderung und den Abbau in vivo und post mortem (p. m.) wurden durchgeführt (Dahl und Bignami 1976; Goldman et al. 1978; Eng 1985). GFAP wird jetzt schon seit über 30 Jahren als Marker in der Forschung genutzt um Astrocyten spezifisch darzustellen. Die Gewinnung und der Einsatz von Antikörpern zur Darstellung des GFAP hat seit der Isolierung des Proteins seinen festen Platz in der Forschung eingenommen (Uyeda et al. 1972; Eng 1985). Da Astrocyten bei pathologischen Veränderungen, Krankheiten und bei toxischen Reizen schnell mit einer Gliose reagieren (Norenberg 1994) und sich die Anfärbbarkeit des Proteins verändert, stellt das GFAP einen interessanten und zuverlässigen Marker zum Nachweis von entwicklungsbedingten und pathologischen Veränderungen dar (Dahl und Bignami 1973; Eng und Ghirnikar 1994; McLendon und Bigner 1994). Stellvertretend für das weite Forschungsfeld soll hier auf die Forschungsarbeiten von O'Callaghan verwiesen werden: „...Our findings indicate that assays of GFAP represent a sensitive, simple and quantitative approach for evaluation of nervous system damage...“ (O'Callaghan et al. 1995).

Um den Aufgaben und Eigenschaften des Proteins weiter auf den Grund zu gehen, werden Tier- sowie in vitro-Versuche durchgeführt bei denen GFAP eliminiert wurde oder eine übermäßige Produktion hervorgerufen wurde (Weber und Geisler 1985; Galou et al. 1997; Messing und Brenner 2003). Erhöhte Präsenz zeigt GFAP nicht nur bei Alzheimer, MS-Plaques (Eng et al. 2000) und bei Trisomie 21 (Becker et al. 1991). Eine Genmutation des Proteins liegt bei der Alexander Krankheit vor und ist verantwortlich für die Bildung der charakteristischen Rosenthal Fasern (Suri 2001; Namekawa et al. 2002; Jacob et al. 2003).

In unserer Studie wurde GFAP immunhistochemisch in Schnitten des Frontallappens mit monoklonalen Antikörpern angefärbt mit dem Ziel, den Zerfall der Tertiärstruktur des Proteins und damit auch seiner antigenen Strukturen p. m. durch die einsetzenden Fäulnisprozesse zur Todeszeiteinschätzung zu nutzen. Damit schließt sich diese Arbeit einer Reihe von immunhistochemischen Untersuchungen zur Eingrenzung der Todeszeit mit verschiedenen Proteinen an, bei denen die Anfärbbarkeit über die Zeit p. m. untersucht wurde. Es ergaben sich bei Insulin (Wehner et al. 1999), Thyroglobulin (Wehner et al. 2000), Glucagon (Wehner et al. 2001b), Calcitonin (Wehner et al. 2001a), Cystatin C (Wehner et al. 2002) und Somatostatin (Wehner et al. 2003) jeweils verschiedene Zeitfenster.

Auch in dieser Studie soll der Frage nachgegangen werden wie lange sich das Protein nach Eintritt des Todeszeitpunktes immunhistochemisch nachweisen lässt, und wie der Nachweis zur Todeszeitbestimmung genutzt werden kann.

Durch jahreszeitlichen und Fundortvergleich, sowie der Gegenüberstellung einer Vergleichsreihe mit erfassbaren Umgebungsbedingungen, werden im zusammengetragenen Material Einflussfaktoren mit ihrer Gewichtung ermittelt. Wie sie bei der Todeszeitbestimmung berücksichtigt werden können wird im Anschluss diskutiert.

## **2 Material und Methodik**

Bei Material und Methodik konnten Erfahrungen aus vorangegangenen Studien und Untersuchungen zur Todeszeitbestimmung der Arbeitsgruppe berücksichtigt werden: Insulin (Wehner et al. 1999), Thyroglobulin (Wehner et al. 2000), Glucagon (Wehner et al. 2001b), Calcitonin (Wehner et al. 2001a), Cystatin C (Wehner et al. 2002) und Somatostatin (Wehner et al. 2003). Frühere Fallzahlschätzungen mit statistischer Absicherung halfen von Anfang an, mit einem ausreichend großen Kollektiv von Gewebeproben zu arbeiten.

### **2.1 Material - menschliche Asservate**

Aus dem Asservat-Archiv des Gerichtsmedizinischen Institutes Tübingen stammt das menschliche Material für die vorliegende Studie.

508 Fälle wurden per Zufallsprinzip aus den Datenbanken und Sektionsprotokollen der Jahre 1995 bis 2002 ausgewählt, bei denen Gehirnteile fixiert und asserviert wurden.

Das wichtigste Auswahlkriterium war hierbei, dass die Liegezeit der Leichen eindeutig begrenzt werden konnte. Eine sichere kriminalpolizeiliche Bestimmung des Todeszeitpunktes auf + / - 1 Tag musste vorliegen. Leichen mit extremen Umgebungseinflüssen - wie starker Hitze - schlossen sich alleine dadurch aus, dass nur asservierbares Organmaterial verwendet werden konnte. Bei den ausgewählten Fällen waren weder prämortale Gehirnerkrankungen noch Anomalien bekannt. Auf sonstige Zustände, Begebenheiten oder das Umfeld zum Todeszeitpunkt wurde keine Rücksicht genommen. Nach Kontrolle der Fälle auf die Ein- und Ausschlusskriterien musste auf 10 Präparate

verzichtet werden, so dass 498 Fälle mit Liegezeiten von 0 bis 36 Tagen untersucht wurden.

Aus den in 4%-igem wässrigem und gepuffertem Formaldehyd fixierten Gehirnteilen wurden Großhirnteile mit Rindenregionen (wenn möglich Frontallappen) entnommen, da diese standardmäßig asserviert werden. Eine 3 bis 5 mm dicke Schicht wurde abgetrennt und auf Präparatgröße eingeschnitten.

Als ein beliebiges weiteres Organ wurde die Schilddrüse ausgewählt. Nach dem Zufallsprinzip wurde ein Fall mit einer Liegezeit von einem Tag untersucht.

## **2.2 Material - Mäusekadaver**

Mit Mäusekadavern wurde in dieser Studie gearbeitet, um eine standardisierte Vergleichsreihe mit erfassbaren Umgebungsbedingungen erstellen zu können. Definierte Bedingungen konnten geschaffen werden, indem immer dieselbe Versuchstiergattung verwendet und Einfluss auf die Liegezeit und den Liegeort mit den Umgebungsbedingungen genommen werden konnte. Die immunhistochemische Anfärbbarkeit von GFAP in Hirnschnitten konnte so an vergleichbaren Fällen untersucht werden.

Bei den Versuchstieren stand das Kriterium des organisch gesunden Gesamtgehirns im Vordergrund. Die Verfügbarkeit und Handhabung führten mit zu der Auswahl von Labormäusen. Die zentrale Versuchstierversorgung der Universität Tübingen belieferte die Studie. Die unter gleichen Bedingungen gehaltenen weiblichen Versuchstiere gleicher Konstitution wurden nach ihrem Abtöten dieser Studie zur Verfügung gestellt.

Vier jahreszeitlich abgestimmte Versuchsreihen mit je 21 Tieren sind in den Zeiträumen 01.10.2002-11.10.2002, 03.02.2003-13.02.2003, 21.03.2003-31.03.2003 und 27.06.2003-07.07.2003 durchgeführt worden. Eine Gruppe mit 10 Tieren wurde im Haus unter bewohnbaren Bedingungen (Raumtemperatur) ausgelegt, eine weitere ebenfalls mit 10 Tieren im Freien nur mit einem Käfig geschützt. Auf gleiches Vorgehen wurde geachtet: Gehirngewebe einer Maus

zum Zeitpunkt 0 und Gewebe von je zwei Mäusen nach 2, 4, 6, 8 und 10 Tagen von jeder Gruppe wurde in 4%-igem abgepuffertem, wässrigem Formaldehyd fixiert und asserviert.

## 2.3 Methodik - Histologie

Um eine histologische Untersuchung durchführen zu können, muss das Organgewebe vorbehandelt werden.

An erster Stelle steht hier die Fixierung mit Konservierung und Härtung. Die Immersionsfixierung des Organmaterials mit 4%-igem gepuffertem Formaldehyd über mind. 48 Stunden wurde nach dem Einschneiden und Verbringen des Organmaterials in Einbettkassetten fortgesetzt. Um das gehärtete Gewebe in eine schneidbare Form zu überführen, folgt die Paraffineinbettung. Eine Vorbehandlung aufgrund der hydrophoben Eigenschaften muss vorangehen, bevor die Lösungsmittel durch das Paraffin ersetzt werden können. Bei dem Entwässerungsprozess steht am Anfang das 4-stündige Auswaschen (Leitungswasser) des Fixationsmittels, bevor sich eine ansteigende Alkoholreihe (70 bis 99,9 Vol% Ethanol, Isopropanol, Xylol) in einem automatisierten Gewebe-Einbettautomat (Citadel 1000<sup>R</sup>, Fa Shandon) anschließt. Das Einbetten in erwärmtem Paraffin (Sherwood -Medical<sup>R</sup>-Komplex aus gereinigtem Paraffin und Kunststoffpolymeren mit Zusatz von Dimethylsulfoxid) bewirkt die Schnellinfiltration der Gewebe. Abschließend wurden noch die Hohlräume um die Gewebeteile in vorgewärmten Gussformen mit verflüssigtem (60°C) Paraffin (Fa Jung: Histotap<sup>R</sup>) ausgefüllt.

Von den gekühlten Paraffinblöckchen (Gefrierplatte -4°C, Fa Shandon) wurden an einem Rotationsmikrotom (Microm HM 330, Heidelberg) Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 3 Mikrometern abgetrennt.

Die Schnitte wurden blasen- und faltenfrei auf Adhäsiv-Objektträger (Histobond, Fa Marienfeld) aufgezogen. Nach 24-stündigem Antrocknen waren die Präparate für die Färbung fertiggestellt.

## 2.4 Methodik - Immunhistochemie

Die Immunhistologie ist eine der zentralen Methoden der modernen histopathologischen Diagnostik und Forschung. Es ist möglich, Strukturen gegen die Antikörper gebildet werden können, hochspezifisch nachzuweisen. Die Antikörper dienen zum Nachweis der von ihnen spezifisch erkannten Antigene und binden an deren Epitope molekulare Strukturen eines Antigens. Polyklonale Antikörper sind natürliche Gemische der Antikörper, die im Zuge einer Immunreaktion gegen verschiedene Determinanten eines Antigens gebildet werden und haben daher ein breites Reaktionsspektrum. Monoklonale Antikörper zeichnen sich dagegen durch ihre hohe und enge Spezifität aus. Markersubstanzen wie Fluoreszenzfarbstoffe oder Enzyme werden zur Sichtbarmachung von Antigen-Antikörperreaktionen angewandt. Verschiedene Methoden mit unterschiedlicher Sensitivität stehen zur Verfügung.

Um GFAP nachzuweisen, wurde in dieser Studie die hoch sensitive Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) angewandt. Nach Entparaffinierung, hitzeinduzierter Demaskierung und Blockierung mit Biotin, Peroxidase (Markersubstanz) und Normalserum wurde ein monoklonaler Antikörper (Monoclonal Mouse Anti-Human Glial Fibrillary Acidic Protein, Code No. M 0761, Fa DAKO A/S) in Kombination mit dem Sekundärantikörper (Kaninchen Anti-Maus biotiniliert) erfolgreich eingesetzt. Zur Sichtbarmachung des gewebsgebundenen Antigen-Antikörperkomplexes setzte man als Markersubstanz Meerrettich-Peroxidase ein, die farbloses Chromogen in ein farbiges Enzymprodukt umwandelt.

Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Schnitt (Kontrollschnitt) bei der Färbung mitgeführt. Bei einem Verfahren wurde ohne den Primär-Antikörper gefärbt, bei einem weiteren das Serum der Proteinblockierung anstelle des Sekundär-Antikörpers verwendet.

Färbeprotokoll siehe Anhang 1.

## 2.5 Methodik - Datenaufbereitung und Auswertung

Alle Präparate wurden auf ihre Anfärbarkeit unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Durch die Färbung mit saurem Hämatoxylin stellen sich Zellstrukturen, hauptsächlich Zellkerne durchweg in blauem bis schwarzem Farbton dar. Bei Zustandekommen eines Antigen-Antikörperkomplexes mit Sekundärantikörper kann die DAB-Lösung mit dem angelagerten Avidin-Biotin Komplex zu einem braunen Farbton reagieren. Da eine Hintergrundfärbung durch die umfangreichen Vorbehandlungen unterdrückt wurde, konnte eine Färbung als positiv gewertet werden, wenn sich das Zellfilament hauptsächlich der Astrocyten der grauen Substanz (Shehab et al. 1990) in einem satten, dunkelbraunen Farbton darstellte (Borit et al. 1986).

Die Ergebnisse der histologischen Auswertung wurden zusammen mit der jeweiligen Liegezeit, Liegezeit vor Ort (Todeszeitpunkt bis zum Auffinden der Leiche), dem Datum des Ablebens, sowie der Sektion und dem Auffindeort in eine Tabelle aufgenommen (Anhang 2).

**Abbildung 1:** gefärbte humane Gehirnschnittpräparate (Frontallappen).

Abb. 1a: positive immunohistochemische Reaktion

Abb. 1b: Negativkontrolle

Abb. 1a:

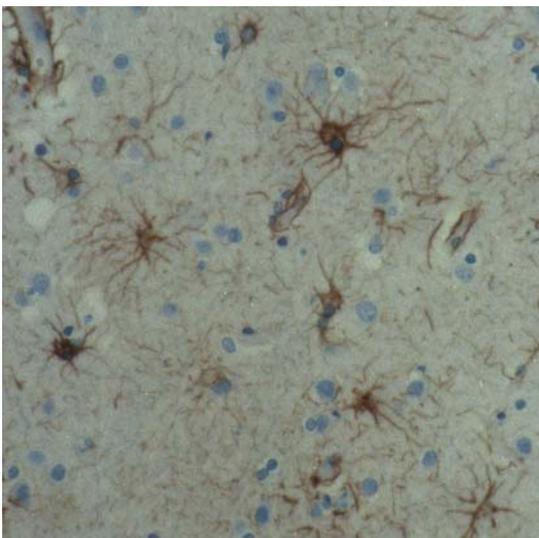
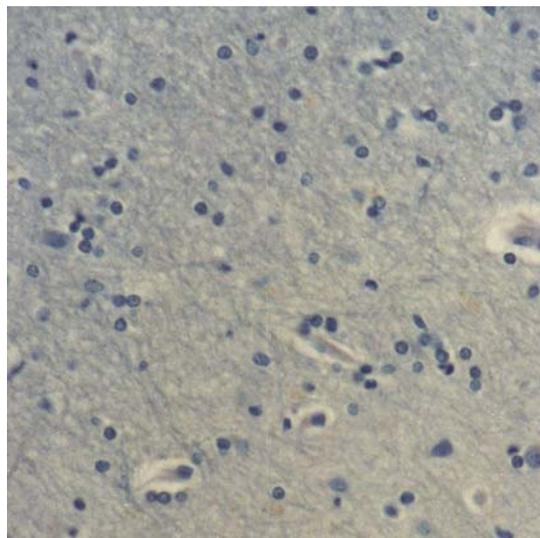


Abb. 1b:



Eingesetzt wurden die Programme Microsoft Excel 2000 und Word 2000. Für die statistische Auswertung und Kurvenanalyse war das Programm JMP Version 4.0.5 und Version 3.2.6 SAS Institute Inc in Gebrauch.

Betreut wurde die statistische Auswertung dieser Studie im Institut für Medizinische Biometrie.

Um Fragestellungen zur Wahrscheinlichkeit der Anfärbbarkeit (bzw. Nichtanfärbbarkeit) sowie die Vorhersage der Liegezeit bei positiver (bzw. negativer) immunhistochemischer Reaktion zu beantworten, wurden logistische Regressionsanalysen angewandt. Mit Hilfe der linearen logistischen Regression wird eine Vorhersage über die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins bzw. Nichtvorhandenseins eines Merkmales getroffen. Damit Werte zwischen 0 und 1 geschätzt werden können, wird dabei nicht der Anteil der Merkmalsträger an sich beschrieben, sondern intern eine Transformation (Logit-Transformation) durchgeführt. Diese Form der Auswertung wird besonders dann interessant, wenn mehr als eine Regressionsvariable verwendet wird.

Hier wurde ein Vorhersagemodell für die positive / negative Anfärbbarkeit von Hirnschnitten abhängig von der Liegezeit p. m., dem Fundort (im Freien / im Innenraum) und dem Halbjahr (Sommerhalbjahr / Winterhalbjahr) entwickelt.

In einem zweiten Modell wurde zusätzlich der Einfluss der Kühlzeit bis zur Obduktion / Asservation (Zeitraum zwischen dem Auffinden einer Leiche und deren Obduktion, in welchem die meisten Leichen gekühlt aufbewahrt werden) untersucht: dazu wurde als Zielvariable die Leichenliegezeit vor Ort (LvO – Zeitraum vom Todeszeitpunkt bis zum Auffinden der Leiche) mit den Einflussfaktoren Kühlzeit und Halbjahr (Sommer / Winter) vorhergesagt.

Berücksichtigt werden muss, dass bei aufgefundenen Leichen weit mehr Fälle mit kurzer Liegezeit auftreten als mit mittlerer oder langer. Um Werte für diese ungleichmäßige Verteilung zu erhalten, wurden Daten der Liegezeit und der Liegezeit vor Ort aller Sektionsprotokolle der Jahre 1995 – 2002 des Institutes für gerichtliche Medizin Tübingen in einer zweiten Tabelle erhoben (Tabelle 1). Ausgeschlossen wurden dabei die Fälle, bei denen die immunhistochemische Anfärbung des GFAP nicht anwendbar wäre, da kein Gehirnmaterial asservierbar war, eine Exhumierung vorlag oder für die statistische Auswertung

wichtige Daten wie Liegezeit / Todeszeitpunkt und Ort nicht angegeben oder bekannt waren (ausgeschlossen insgesamt 436 von 3421 Fällen).

**Tabelle 1:** Darstellung der Fallzahlen (Anzahl Leichen) des Institutes (1995 - 1996 und 1998 - Sept. 2002). Genannt wird ebenfalls die Anzahl der asservierten Gehirne und der ausgeschlossenen Leichen, gefolgt von der Anzahl der Leichen, die in unserer Auswertung berücksichtigt werden.

Jahr	Anzahl Leichen	Gehirnmaterial asserviert	ausgeschlossene Leichen	verwendete Anzahl
1995	552	512	83	469
1996	532	508	64	468
1998	495	471	46	449
1999	422	408	48	374
2000	459	445	49	410
2001	551	519	92	459
2002	412	394	56	356
Gesamt	3421			2985

Bei den für unsere Auswertung aufgenommenen 2985 verwendeten Leichen (Leichen bei denen der Test angewendet werden kann) teilte sich die Fallverteilung über die Liegezeit wie in Tabelle 2 dargestellt auf.

Um den Informationsgewinn des Testes darzustellen, wurde für jeden Tag der Likelihood Quotient (LQ) berechnet. Von allen im Institut untersuchten Leichen mit einer Liegezeit  $t$  wurde derjenige Anteil  $p(t)$  ermittelt, der eine gegebene Liegezeit  $t$  hatte. Dieser Anteil gibt uns die A-priori-Wahrscheinlichkeit. Aus ihr wurde dann die A-priori-Chance  $o(t)$  (Odds) ausgerechnet [ $o(t) = p(t) / (1-p(t))$ ]. Unter Zuhilfenahme der Kurve der logistischen Regression wurde aus A-priori-Wahrscheinlichkeit eine A-posteriori-Wahrscheinlichkeit  $p(t,+)$  bei Vorliegen eines positiven (+) Testergebnisses berechnet. Auch diese Wahrscheinlichkeit wurde wieder in eine Chance umgerechnet [ $o(t,+) = p(t,+) / (1-p(t,+))$ ].

**Tabelle 2:** Leichenliegezeiten LL (in Tagen) der verwendeten 2985 Leichen in den Jahrgängen 1995 - 2002 des Institutes. Angaben absolut und relativ (bezogen auf die Gesamtzahl der Leichen des Jahres).

( $\leq 1$  steht in der Auswertung für 1Tag;  $\geq 21$  steht für eine Liegezeit von 21 Tagen oder länger, Leichen mit längerer Liegezeit werden bei der Auswertung hier zusammengefasst).

Jahr LL	1995		1996		1998		1999		2000		2001		2002		Gesamt	
$\leq 1$	208	45%	198	42%	215	48%	159	43%	207	50%	203	44%	167	47%	1357	45%
<b>2</b>	122	26%	135	29%	102	23%	93	25%	101	25%	121	26%	76	21%	750	25%
<b>3</b>	47	10%	55	12%	53	12%	51	14%	40	10%	51	11%	40	11%	337	11%
<b>4</b>	33	7%	27	6%	25	6%	25	7%	24	6%	25	5%	26	7%	185	6%
<b>5</b>	20	4%	16	3%	10	2%	8	2%	16	4%	12	3%	11	3%	93	3%
<b>6</b>	11	2%	7	1%	8	2%	8	2%	4	1%	10	2%	9	3%	57	2%
<b>7</b>	7	1%	8	2%	7	2%	8	2%	3	1%	4	1%	5	1%	42	1%
<b>8</b>	5	1%	9	2%	5	1%	3	1%	2	0%	2	0%	1	0%	27	1%
<b>9</b>	3	1%	1	0%	3	1%	0	0%	1	0%	5	1%	1	0%	14	0%
<b>10</b>	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
<b>11</b>	3	1%	3	1%	8	2%	4	1%	3	1%	8	2%	7	2%	36	1%
<b>12</b>	0	0%	0	0%	3	1%	1	0%	3	1%	1	0%	3	1%	11	0%
<b>13</b>	1	0%	0	0%	2	0%	0	0%	2	0%	1	0%	2	1%	8	0%
<b>14</b>	0	0%	0	0%	1	0%	1	0%	0	0%	2	0%	0	0%	4	0%
<b>15</b>	1	0%	1	0%	3	1%	3	1%	1	0%	2	0%	1	0%	12	0%
<b>16</b>	0	0%	2	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	1	0%	3	0%
<b>17</b>	0	0%	0	0%	2	0%	1	0%	0	0%	0	0%	2	1%	5	0%
<b>18</b>	1	0%	3	1%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	4	0%
<b>19</b>	0	0%	0	0%	0	0%	1	0%	0	0%	1	0%	0	0%	2	0%
<b>20</b>	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
$\geq 21$	5	1%	5	1%	2	1%	8	2%	3	1%	11	2%	4	1%	38	1%
<b>Ges.:</b>	469	100%	468	100%	449	100%	374	100%	410	100%	459	100%	356	100%	2985	100%

Diesen Informationsgewinn, der aus dem positiven Testergebnis resultiert, bezeichnet man als LQ (t,+) [ $L(t,+) = o(t,+) / o(t)$ ]. Der LQ ist also ein Multiplikationsfaktor, mit dem die A-priori-Chance multipliziert werden muss, um die A-posteriori-Chance zu erhalten. Er gibt damit an, wie viel Mal so

"wahrscheinlich" es ist, dass eine Leiche  $t$  Tage gelegen hat, wenn man zusätzlich das Wissen erhält, dass das Präparat der Leiche noch anfärbbar ist. Zum Vergleich der im Sommer- und im Winterhalbjahr gefundenen Leichen bzw. der im Innenraum oder im Freien gefundenen, wurden Chancenquotienten (Odds Ratios) berechnet, die angeben, wie viel Mal so hoch die Chance für die Anfärbbarkeit im Sommer- / Winterhalbjahr bzw. im Innenraum / im Freien war.

Lichtmikroskopisch wurden die Tierkadaverpräparate nach demselben Verfahren ausgewertet wie die humanen. Die Ergebnisse, der mit den Mäusekadavern erstellten jahreszeitlichen Vergleichsreihe mit erfassbaren Umgebungsbedingungen, werden in Blockdiagrammen dargestellt.

### 3 Ergebnisse

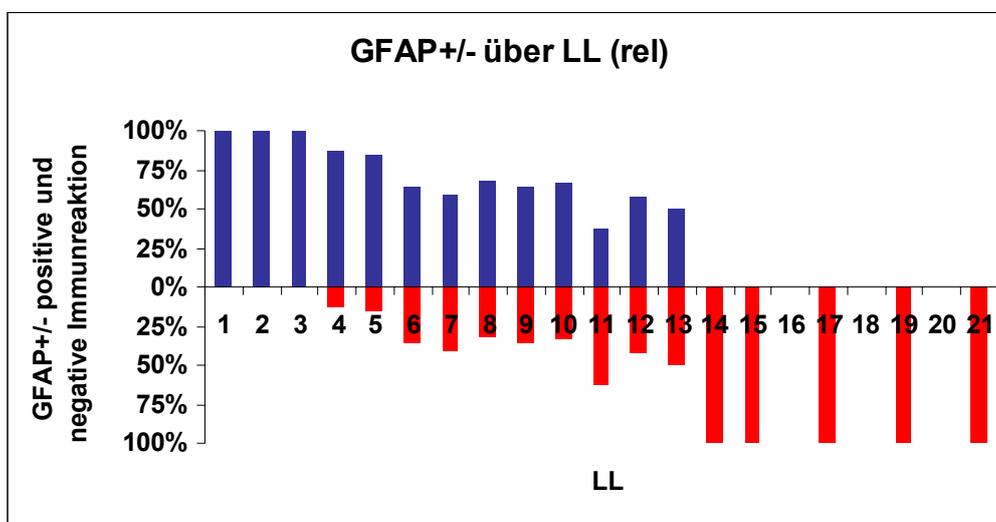
#### 3.1 Humanes GFAP

Nach dem Auswerten der immunhistochemisch gefärbten humanen GFAP-Präparate ergab sich bei insgesamt 410 Fällen von 498 eine positive Reaktion der Anfärbbarkeit des GFAP. Keine der mitgefärbten Negativkontrollen konnte positiv ausgewertet werden.

Die Färbung des Kontrollorganes Schilddrüse ist negativ, so dass die angegebene Spezifität des Antikörpers in diesem Fall bestätigt werden kann.

In Tabelle 3 ist die Häufigkeit einer positiven bzw. negativen Anfärbbarkeit in Abhängigkeit von der Leichenliegezeit (LL) dargestellt.

**Abbildung 2:** Ergebnisdiagramm der GFAP-Anfärbbarkeit (GFAP+/-) post mortem (p. m.). Relative Angaben über die Leichenliegezeit (LL).



**Tabelle 3:** GFAP-Anfärbarkeit (GFAP+) / Nichtanfärbarkeit (GFAP-) von Hirngewebe (absolut und relativ) in Abhängigkeit der Leichenliegezeit (LL).

LL	Fallzahl	GFAP+		GFAP-	
≤1	72	72	100%	0	0%
2	70	70	100%	0	0%
3	61	61	100%	0	0%
4	80	70	88%	10	13%
5	59	50	85%	9	15%
6	48	31	65%	17	35%
7	32	19	59%	13	41%
8	19	13	68%	6	32%
9	11	7	64%	4	36%
10	12	8	67%	4	33%
11	8	3	38%	5	63%
12	7	4	57%	3	43%
13	4	2	50%	2	50%
14	1	0	0%	1	100%
15	4	0	0%	4	100%
16	0	0	0%	0	100%
17	3	0	0%	3	100%
18	0	0	0%	0	100%
19	1	0	0%	1	100%
20	0	0	0%	0	100%
≥21	6	0	0%	6	100%

Die benannten Einflussfaktoren auf die immunhistochemische Anfärbarkeit des GFAP zeigen bei den Ergebnissen eine Verschiebung des Zeitfensters. So kann aus den Abbildungen 3a/b abgelesen werden, dass im Sommerhalbjahr wahrscheinlich klima- und temperaturbedingt negative Färbeergebnisse früher und häufiger eintreten (am 4. Tag sind schon nahezu 25% der Fälle negativ), wobei positive früher verschwinden (siehe 12. Tag p. m. mit ausschließlich negativen Ergebnissen). Im Winterhalbjahr ist am 4. und 5. Tag p. m. das Auftreten von negativen Fällen vernachlässigbar gering, das Eintreten von

negativen Fällen über 50% findet erst ab dem 14. Tag p. m. statt, wobei noch eine Anfärbarkeit aller Fälle am 13. Tag p. m. abzulesen ist.

**Abbildung 3:** Ergebnisdiagramm der GFAP-Anfärbarkeit p. m. (relative Angaben über die Leichenliegezeit LL).

Abb. 3a zeigt die Ergebnisse des Sommerhalbjahres (Mai – September).

Abb. 3b fasst die Werte des Winterhalbjahres (Oktober - April) zusammen.

Abb. 3a:

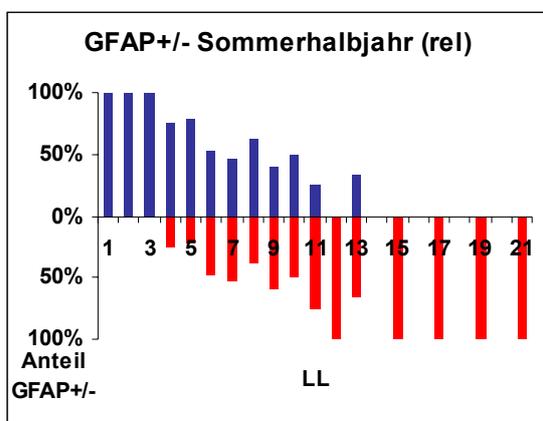
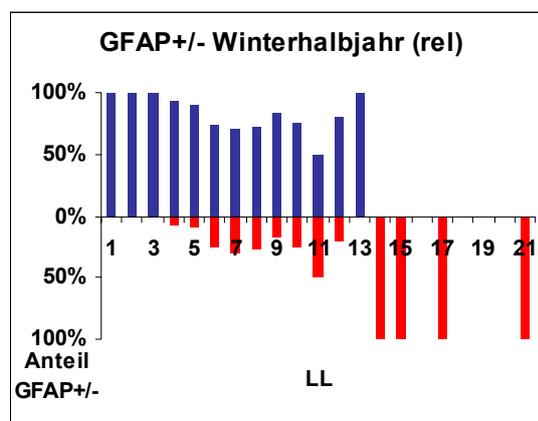


Abb. 3b:



Die Veränderung und Verschiebung des Zeitfensters bei zusätzlicher Berücksichtigung des Leichenfundortes (im Freien / im Innenraum) wird in Abbildung 4a/b/c/d gezeigt. Bei 100 Fällen handelt es sich um Leichen mit Fundort im Freien, 52 von ihnen wurden im Winterhalbjahr gefunden, 49 im Sommerhalbjahr, so dass man von einer Verteilung zu gleichen Teilen zwischen den Halbjahren sprechen kann. 398 Leichen wurden im Innenraum aufgefunden, die Verteilung zwischen Sommerhalbjahr (177 Fälle) und Winterhalbjahr (221 Fälle) beträgt 4:5 und somit annähernd 50%. Eine Voraussage ist aus den Diagrammen der Fälle mit Fundort im Inneren durch die größere Fallzahl und den harmonischeren und schlüssigeren Verlauf der Balkendiagramme verlässlicher möglich. Bei Fundleichen im Freien muss aufgrund der reduzierten Fallzahl und der auftretenden extremen Schwankungen vorsichtiger vorgegangen werden.

**Abbildung 4:** Ergebnisdiagramm der GFAP-Anfärbbarkeit p. m. (relative Angaben über die Leichenliegezeit LL).

Abb. 4a: Ergebnisse Sommerhalbjahr (Mai – September), Fundort im Freien.

Abb. 4b: Ergebnisse Sommerhalbjahr, Fundort im Innenraum.

Abb. 4c: Werte Winterhalbjahr (Oktober - April), Fundort im Freien.

Abb. 4d: Werte Winterhalbjahr, Fundort im Innenraum.

Abb. 4a:

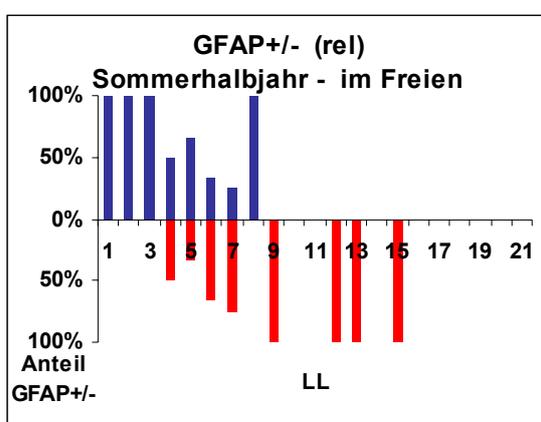


Abb. 4b:

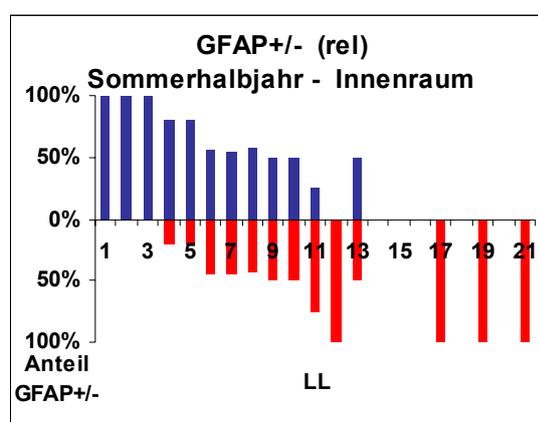


Abb. 4c:

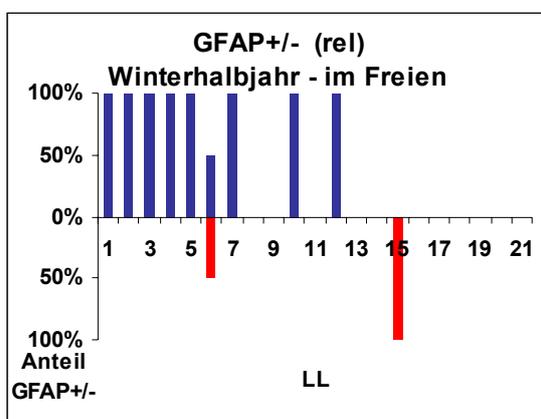
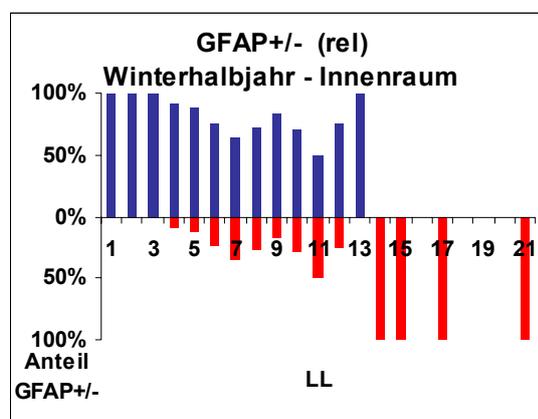


Abb. 4d:



Positive Färbereignisse treten sowohl im Sommer- als auch im Winterhalbjahr im Innenraum bis inklusive 13. Tag auf, wobei negative ab dem 4. Tag ausgewertet werden können. Die positiven Auswertungen überwiegen im Winterhalbjahr im Innenraum (Abb. 4d) bis einschließlich 14. Tag deutlich. Das

Zeitfenster zwischen dem 4. und einschließlich 13. Tag zeigt ein ziemlich konstantes Verhältnis zwischen den anfärbbaren und nicht anfärbbaren Fällen ( $\approx 25\%$  der Fälle werden ab dem 4. Tag täglich negativ ausgewertet, bis ab dem 14. Tag 100% erreicht werden). Im Sommerhalbjahr treten im Innenraum (Abb. 4b) häufiger negative Ergebnisse auf, der stetige Abfall innerhalb des Zeitfensters verläuft harmonischer und lehnt sich an den Verlauf des in Abbildung 2 dargestellten Diagramms an. Circa 50% der Fälle sind ab dem 4. Tag täglich negativ bis am Tag 12 und dann ab dem 14. Tag ausschließlich negative Ergebnisse erreicht werden. Ein klarer Ergebnisumschlag von "in jedem Fall anfärbbar" (ausgenommen Tag 6 mit einem negativen Fall) bis einschließlich 12. Tag auf "in keinem Fall mehr anfärbbar" (ab dem 14. Tag) finden wir bei im Freien während des Winterhalbjahres aufgefundenen Leichen (Abb. 4c). Aus dem Diagramm bei Fund im Sommerhalbjahr im Freien (Abb. 4a) lässt sich ablesen, dass die Balken mit negativem Ergebnis schnell ab dem 4. Tag p. m. auf Beträge über 50% absinken, bis am 9. Tag das erste Mal alle Fälle negativ ausgewertet wurden – 4 Tage früher als aus der Gesamtauswertung (Abb. 2) hervorgeht.

Zusammenfassend lässt sich formulieren, dass die 100%-ige Nichtanfärbbarkeit bei Fundleichen im Sommerhalbjahr früher eintritt, während man bei Fundsituationen im Winterhalbjahr eindeutige Angaben über die Anfärbbarkeit bzw. Nichtanfärbbarkeit machen kann.

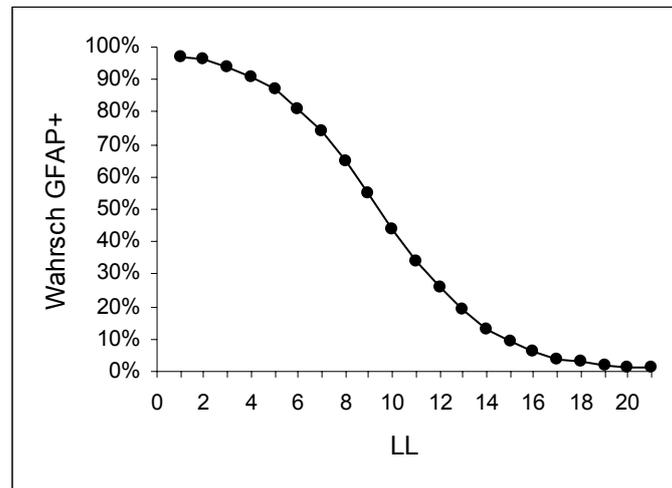
In Abbildung 5 ist die Anfärbwahrscheinlichkeit über die Liegezeit in Form einer Kurve unter Anwendung der linearen logistischen Regression dargestellt. Der sigmoidale Kurvenverlauf geht mit zunehmender Zeit gegen 0.

$$\text{Wahrsch (GFAP +)} = \frac{1}{1 + e^{-3,957 + 0,418 * LL}}$$

Die Wahrscheinlichkeit der Anfärbbarkeit bei bekannter Liegezeit ist in den ersten Tagen am höchsten, wobei die Anfärbwahrscheinlichkeit bis zum 4. Tag über 90% liegt, sinkt dann jedoch rapide, wie aus dem steilen Kurvenabfall ersichtlich ist. Zwischen dem 9. und 10. Tag fällt der Wendepunkt der Kurve, so

dass hier die Anfärbewahrscheinlichkeit 50% beträgt, bis sie ab Tag 15 die geringsten Wahrscheinlichkeitswerte von unter 10% erreicht hat.

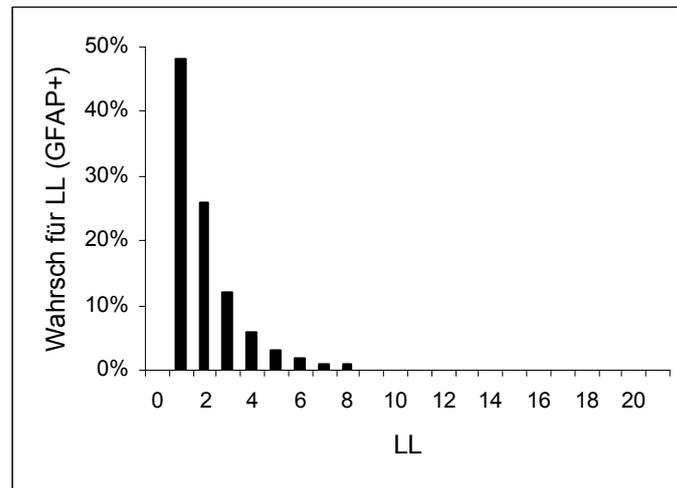
**Abbildung 5:** Wahrscheinlichkeit der Anfärbbarkeit (Wahrsch GFAP+) bei gegebener Leichenliegezeit (LL).



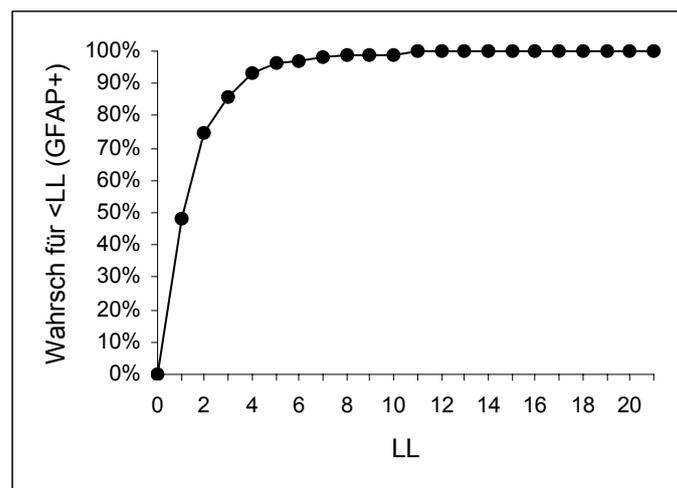
Die zusätzlich mit der Methode der logistischen Regression erstellten Diagramme, bei denen **die ungleiche Liegezeitverteilung berücksichtigt** wurde, geben bei eingetretener positiver immunhistochemischer Färbung zum einen Auskunft über die Wahrscheinlichkeit wie viel Tage eine Leiche liegt (Abb. 6), und zum anderen (in Abb. 7) wie viel Prozent der Leichen sich jeweils an einem Tag und dem Zeitraum darunter befinden.

Bei einem positiv gefärbten Fall (GFAP+) ist davon auszugehen, dass eine Liegezeit von bis einschließlich 3 Tagen vorliegt. Die Vorhersage gibt für einen Liegetag annähernd die Wahrscheinlichkeit von 50% an, welche für den zweiten Tag mit annähernd 25% und den dritten Tag mit knapp über 10% deutlich sinkt (Abb. 6).

**Abbildung 6:** Wahrscheinlichkeit, dass eine positiv gefärbte Leiche eine bestimmte Anzahl von Tagen (LL) gelegen ist (Wahrsch für LL (GFAP+) – positiv prädiktiver Wert; Modellvorhersage berücksichtigt alle potentiell auswertbaren Leichen des Institutes).



**Abbildung 7:** Aus der Kurve lässt sich ablesen welcher Anteil der Leichen (GFAP+) sich im Zeitraum unterhalb eines bestimmten Tages (LL) befinden (Wahrsch für höchstens LL (GFAP+)).



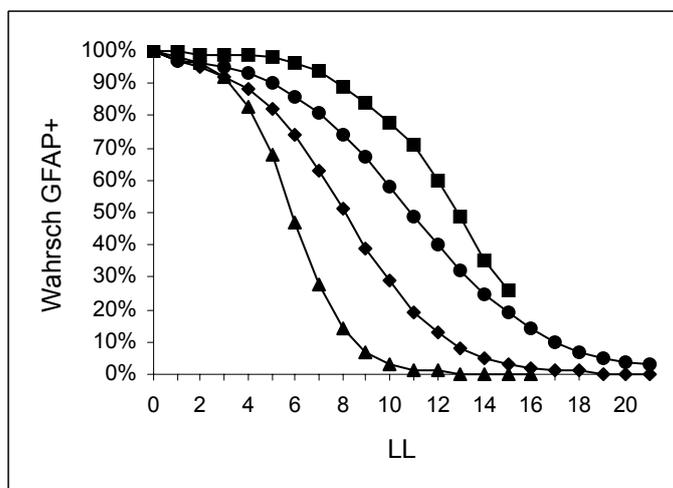
Über 90% der positiv gefärbten Fälle weisen eine Leichenliegezeit von 4 Tagen oder darunter auf, wobei weiter davon ausgegangen werden kann, dass  $\approx 50\%$  eine Liegezeit von bis zu einem Tag aufweisen. Am 8. Tag ist die 100%-ige Anfärbewahrscheinlichkeit gegeben (Abb. 7).

Bei Berücksichtigung der Einflussfaktoren zeigen sich bei dem Datensatz der gefärbten Fälle deutliche Unterschiede im Verlauf der Kurven der Anfärbewahrscheinlichkeit (Abb. 8). Die extremsten Verläufe stellen sich jeweils bei Leichen mit Fundort im Freien dar. Die mittleren, näher am Durchschnitt gelegenen Kurven, sind die der Leichen mit Fundort im Innenraum. Die Anfärbewahrscheinlichkeit im Sommerhalbjahr nimmt schneller ab, ein deutlicher Unterschied - im Rahmen von Tagen - entwickelt sich ab dem 3. Liegetag.

**Abbildung 8:** Wahrscheinlichkeit der Anfärbbarkeit (Wahrsch GFAP+) bei gegebener Leichenliegezeit (LL).

Bei den 4 Kurven werden die Einflussfaktoren Fundort und Todeszeitpunkt sowie ihre Kombinationen berücksichtigt.

- Winterhalbjahr / Innenraum
- ◆— Sommerhalbjahr / Innenraum
- Winterhalbjahr / im Freien
- ▲— Sommerhalbjahr / im Freien



Die Einflussfaktoren mit ihrer Signifikanz sind in Tabelle 4 beschrieben.

**Tabelle 4:** Logistische Regression (Umgeb – Fundort Innenraum / im Freien, Halbj – Todeszeitpunkt im Sommerhalbjahr / Winterhalbjahr, LL – Leichenliegezeit, LL\*Umgeb und LL\*Halbj, Kombinationen).

<b>Einflussfaktoren</b>	<b>p-Wert</b>
Umgeb (Innen/Außen)	0,9680
Halbj (Sommer/Winter)	0,0065
LL	< 0,0001
LL*Umgeb	0,4784
LL*Halbj	0,1616

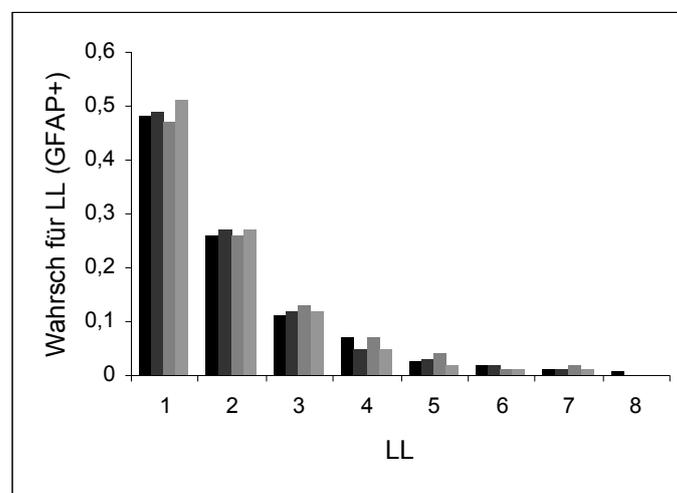
Werden die **Ergebnisse wiederum auf das Gesamtkollektiv der Fälle bezogen**, rücken die Kurven deutlich zusammen. Unterschiede stellen sich nicht mehr so klar dar.

Abbildung 9 gibt bei eingetretener positiver immunhistochemischer Färbung Auskunft über die Wahrscheinlichkeit, wie viel Tage eine Leiche unter Berücksichtigung der Einflussfaktoren Fundort und Todeszeitpunkt liegt. Deutlich fällt die eindeutig häufigere Anfärbbarkeit am 1. Tag p. m. im Sommerhalbjahr mit Fundort im Freien auf. Positive Testergebnisse können am längsten bei Leichen mit Ableben im Winterhalbjahr im Innenraum festgestellt werden – auch noch am 8. Tag. Der 7. Tag p. m. ist der letzte Tag, an dem Schnitte noch angefärbt werden können.

**Abbildung 9:** Wahrscheinlichkeit, dass eine positiv gefärbte Leiche eine bestimmte Anzahl von Tagen (LL) gelegen ist (Wahrsch für LL (GFAP+)) – relative Angaben.

Bei den 4 Säulen werden die Einflussfaktoren Fundort und Todeszeitpunkt sowie ihre Kombinationen berücksichtigt.

- Winterhalbjahr / Innenraum
- Sommerhalbjahr / Innenraum
- Winterhalbjahr / im Freien
- Sommerhalbjahr / im Freien

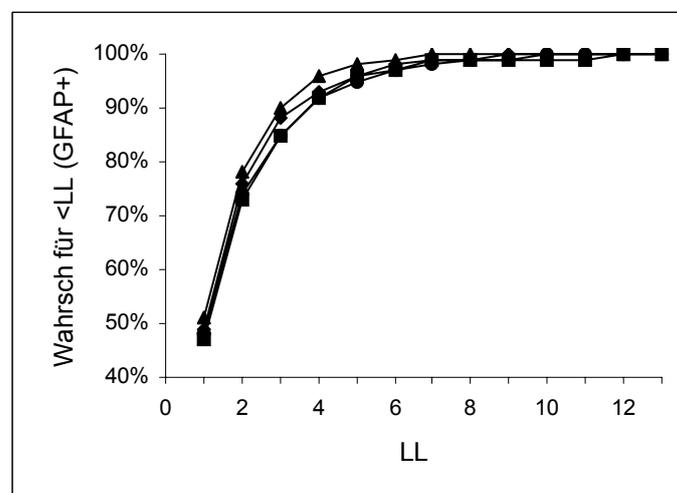


Die kumulative Darstellung der Abbildung 10 zeigt wie viel Prozent der Leichen sich jeweils im Zeitraum bis zu einem bestimmten Tag befinden, wobei auch hier die Einflussfaktoren Fundort und Todeszeitpunkt berücksichtigt wurden.

Die Kurven mit den Einflussfaktoren Winterhalbjahr im Freien und Sommerhalbjahr im Freien rahmen in ihrem Verlauf die Kurven von oben und unten ein, wobei ein Fenster von 5% nicht überschritten wird. Zwischen dem 2. und 10. Tag lässt sich der uneinheitliche Verlauf feststellen.

**Abbildung 10:** Aus den Kurven lässt sich ablesen, welcher Anteil der Leichen (bei positiver Anfärbbarkeit) sich im Zeitraum unterhalb eines bestimmten Tages (LL) befindet (Wahrsch für höchstens LL (GFAP+), relative Angaben). Bei den 4 Kurven werden die Einflussfaktoren Fundort und Todeszeitpunkt sowie ihre Kombinationen berücksichtigt.

- Winterhalbjahr / Innenraum
- ◆— Sommerhalbjahr / Innenraum
- Winterhalbjahr / im Freien
- ▲— Sommerhalbjahr / im Freien



Um den Erkenntnisgewinn des Testes zu objektivieren, wurde der Likelihood Quotient (LQ) berechnet: Tabelle 5. Hierbei zeigt sich im Vergleich der A-posteriori-Chance zur A-priori-Chance um welchen Faktor die Vorhersagewahrscheinlichkeit verbessert werden kann.

Am 5. Tag p. m. lässt sich die vorhergesagte Chance für ein positives Testergebnis durch Anwendung des Testverfahrens verdoppeln, am 9. Tag sogar versechsfachen. Bei großen Werten für LQ (GFAP+) kann keine sichere Vorhersage mehr getroffen werden. Nicht so gute Ergebnisse der Vorhersagegenauigkeit ergeben sich bei negativen Testergebnissen (LQ (GFAP-)). Die Werte des Likelihood Quotienten 0,21 und 0,08 (Tab. 6).

**Tabelle 5:** Likelihood Quotienten (LQ) für positive Anfärbarkeit an den jeweiligen Liegetagen (LL).

A-priori (Wahrscheinlichkeit): Kumulative Häufigkeitsverteilung über die Liegezeit LL aller untersuchten Leichen des Institutes (s. Tab. 2).

A-posteriori: Wahrscheinlichkeit für eine maximale Liegezeit von LL Tagen bei positivem Testergebnis. Ein Modell für die Häufigkeitsverteilung der getesteten Leichen (GFAP+) wurde über die Leichenliegezeit (LL) angepasst. Die A-posteriori-Wahrscheinlichkeiten sind eine mit diesem Modell vorausgesagte Verteilung der Leichenliegezeiten (LL) bezogen auf alle untersuchten Leichen des Institutes (s. Tab. 2).

$LQ (GFAP+) = (a\text{-posteriori } GFAP+ / (1 - a\text{-posteriori } GFAP+)) / (a\text{-priori } GFAP+ / (1 - a\text{-priori } GFAP+))$

LL	a-priori (GFAP+)	LQ (GFAP+)	a-posteriori (GFAP+)
≤1	0,45	1,13	0,48
≤2	0,71	1,24	0,75
≤3	0,82	1,41	0,86
≤4	0,88	1,69	0,93
≤5	0,91	2,07	0,96
≤6	0,93	2,61	0,97
≤7	0,95	3,53	0,98
≤8	0,95	4,87	0,99
≤9	0,96	6,12	0,99
≤10	0,96	6,12	0,99
≤11	0,97	12,44	1
≤12	0,97	19,08	1
≤13	0,98	28,35	1
≤14	0,98	34,78	1
≤15	0,98	76,11	1
≤16	0,98	100,81	1
≤17	0,99	166,14	1
≤18	0,99	273,19	1
≤19	0,99	355,05	1
≤20	0,99	355,05	1
≤21	0,99	989,91	1

**Tabelle 6:** Likelihood Quotienten (LQ) für negative Anfärbarkeit an den jeweiligen Liegetagen (LL).

LQ (GFAP-): Analog zu GFAP+ (s. Tab. 5), wobei nur die negativen Testergebnisse (GFAP-) berücksichtigt wurden.

<b>LL</b>	<b>a-priori (GFAP-)</b>	<b>LQ (GFAP-)</b>	<b>a-posteriori (GFAP-)</b>
<b>≤1</b>	0,46	0,21	0,15
<b>≤2</b>	0,71	0,15	0,27
<b>≤3</b>	0,82	0,12	0,35
<b>≤4</b>	0,87	0,1	0,41
<b>≤5</b>	0,91	0,08	0,46
<b>≤6</b>	0,93	0,07	0,5
<b>≤7</b>	0,94	0,07	0,54
<b>≤8</b>	0,95	0,07	0,58
<b>≤9</b>	0,96	0,07	0,6
<b>≤10</b>	0,96	0,07	0,6
<b>≤11</b>	0,97	0,07	0,69
<b>≤12</b>	0,97	0,07	0,72
<b>≤13</b>	0,98	0,07	0,75
<b>≤14</b>	0,98	0,07	0,76
<b>≤15</b>	0,98	0,07	0,8
<b>≤16</b>	0,98	0,07	0,81
<b>≤17</b>	0,99	0,07	0,83
<b>≤18</b>	0,99	0,08	0,85
<b>≤19</b>	0,99	0,08	0,86
<b>≤20</b>	0,99	0,08	0,86
<b>≤21</b>	0,99	0,08	0,89

Die Einflussfaktoren Umgebung (im Innenraum / im Freien) bzw. Halbjahr (Sommer / Winter) wurden auf ihren Einfluss auf die Anfärbarkeit verglichen (Tabelle 7). Odds Ratios (OR) wurden statt Wahrscheinlichkeiten bevorzugt.

**Tabelle 7:** Vergleich im Innenraum / im Freien (Umgeb Innenraum – im Freien) und Winter- / Sommerhalbjahr (Halbj Winter – Sommer) in ihrem Einfluss auf die Anfärbarkeit mit Odds Ratios. Angabe des 95%-igen Konfidenzintervalles (Odds Lower und Upper).

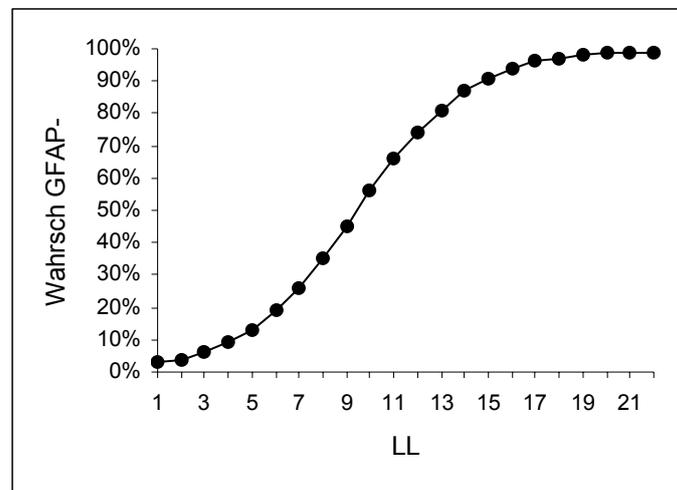
<b>Einflussfaktoren</b>	<b>Odds Ratios</b>	<b>Odds Lower</b>	<b>Odds Upper</b>
Umgeb (Innenraum-im Freien)	0,934	0,444	2,081
Halbj (Winter-Sommer)	0,340	0,186	0,606

Der Vergleich der Fundorte im Innenraum zu denen im Freien ergab ein OR von 0,93 mit 95%-gem Konfidenzintervall von 0,44 – 2,08. Die Anfärbarkeit sinkt im Freien schneller als im Innenraum. Die Chance eines positiven Ergebnisses ist mit Fundort im Freien 0,93 Mal so groß wie mit Fundort im Innenraum. Wobei man sich nicht sicher sein kann, da 1 (d. h. Chancengleichheit) im Konfidenzintervall enthalten ist.

Der Vergleich der Halbjahre (Sommer zu Winter) ergab ein OR von 0,34 mit einem 95%-igen Konfidenzintervall von 0,19 – 0,61. Die Anfärbewahrscheinlichkeit sinkt im Sommer schneller als im Winter. Die Chance auf Anfärbarkeit ist im Sommerhalbjahr rund 0,34 Mal so hoch wie im Winterhalbjahr.

Für den Fall, dass die immunhistochemische Färbung von GFAP negativ ausgewertet wird, stellen sich die Ergebnisse für die Wahrscheinlichkeit einer Nichtanfärbarkeit über die Leichenliegezeit (Abb. 11), die wahrscheinliche Verteilung über die Liegetage (Abb. 12), und die Angabe über den Anteil der Fälle mit negativem Ergebnis in einem bestimmten Zeitraum (Abb. 13) wie folgt dar:

**Abbildung 11:** Wahrscheinlichkeit der Nichtanfärbbarkeit (Wahrsch GFAP-) bei gegebener Leichenliegezeit (LL).

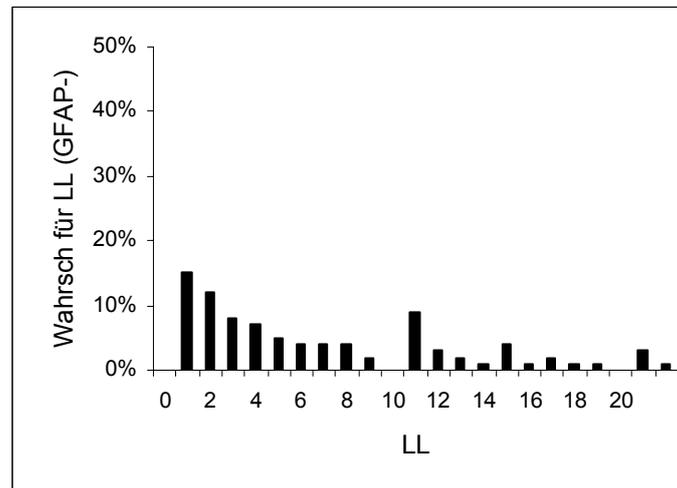


Im Gegensatz zu Abb. 5 mit einem abfallenden sigmoidalen Kurvenverlauf bei Anfärbbarkeit über die Zeit p. m. stellt sich der Kurvenverlauf bei Nichtanfärbbarkeit umgekehrt ansteigend dar. Die geringsten Wahrscheinlichkeitswerte (>10%) zeigen sich an den ersten 3 Tagen, der Wendepunkt fällt zwischen die Tage 9 und 10 (Wahrscheinlichkeit 50%), ab dem 15. Tag liegen die Werte über 90%.

Die Eindeutigkeit der Darstellung bei negativen Färbeergebnissen (Abb. 12) ist wie in Abb. 6 bei positiven Färbeergebnissen nicht gegeben.

Der Verlauf der kumulativen Kurve (Abb. 13) ist deutlich flacher, Aussagen können nicht so eindeutig getroffen werden wie bei GFAP+ Fällen (Abb. 7). 50% der negativen Fälle weisen eine Liegezeit von  $\geq 6$  Tagen auf, die Marke von 90% wird ab dem 18. Tag überschritten.

**Abbildung 12:** Wahrscheinlichkeit, dass eine negativ ausgewertete Leiche eine bestimmte Anzahl von Tagen (LL) gelegen ist (Wahrsch für LL (GFAP-) – negativer prädiktiver Wert; Modellvorhersage berücksichtigt alle Leichen des Institutes).



**Abbildung 13:** Aus der Kurve lässt sich ablesen, welcher Anteil der Leichen (GFAP-) sich im Zeitraum unterhalb eines bestimmten Tages (LL) befindet (Wahrsch für höchstens LL (GFAP-)).

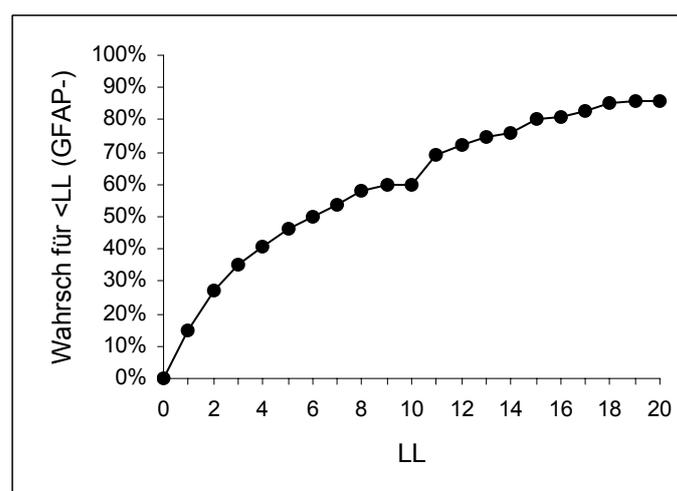


Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse einer logistischen Regression, bei der auch die Kühlzeit mit berücksichtigt wurde. Wie aus dem kleinen p-Wert für die Kühlzeit zu erkennen ist, fällt die Anfärbarkeit während der Kühlphase signifikant ab.

**Tabelle 8:** Logistische Regression.

<b>Einflussfaktoren</b>	<b>p-Wert</b>
LvO	<0,0001
Kühlzeit	<0,0001
Halbj (Sommer/Winter)	0,0004

Das Modell berücksichtigt den Einfluss der bekannten Kühlzeit und des Halbjahres auf die immunhistochemische Anfärbarkeit des GFAP:

$$\text{Wahrsch (GFAP+)} = \frac{1}{1 + e^{-3,847 + 0,340 * \text{Kühlzeit} + 0,493 * \text{LvO} + h}}$$

mit:  $h=0,539$  (für Winterhalbjahr);  $0,539$  (für Sommerhalbjahr)

Der tägliche Anfärbarkeitsverlust ist bei Kühlung um 1/3 geringer, als er es bei der LvO ist. So kann LL als relativ guter Schätzwert herangezogen werden, da die Kühlung fast genauso viel Einfluss auf die Anfärbarkeit nimmt wie die LvO. Die Chance der Anfärbarkeit wird mit jedem Kühltage um den Faktor  $e^{0,340}=1,40$  kleiner.

Die Chance der Anfärbarkeit wird mit jedem LvO (Tag) um den Faktor  $e^{0,493}=1,63$  kleiner.

Die Chance auf Anfärbarkeit nimmt mit jedem LL (Tag) um den Faktor  $e^{0,418}=1,52$  ab.

Die erwartete Verteilung von positiv gefärbten Fällen, in Abhängigkeit von LvO und Kühlzeit, sind in Abbildung 14 für das Sommerhalbjahr und in Abbildung 15 für das Winterhalbjahr dargestellt. Deutlich geht aus den unterschiedlichen Höhen der Balken hervor, dass die Kühlzeit auch einen nicht

vernachlässigbaren Einfluss auf die Anfärbarkeit nimmt. Je länger die Kühlzeit andauert, desto schneller nimmt im Anschluss die Anfärbarkeit der Gehirnschnitte p. m. ab. Bei längerer Kühlzeit treten mehr Fälle an den frühen Liegetagen vor Ort (LvO) auf, und positive Fälle können nicht so lange p. m. dargestellt werden als bei kürzerer Kühlzeit.

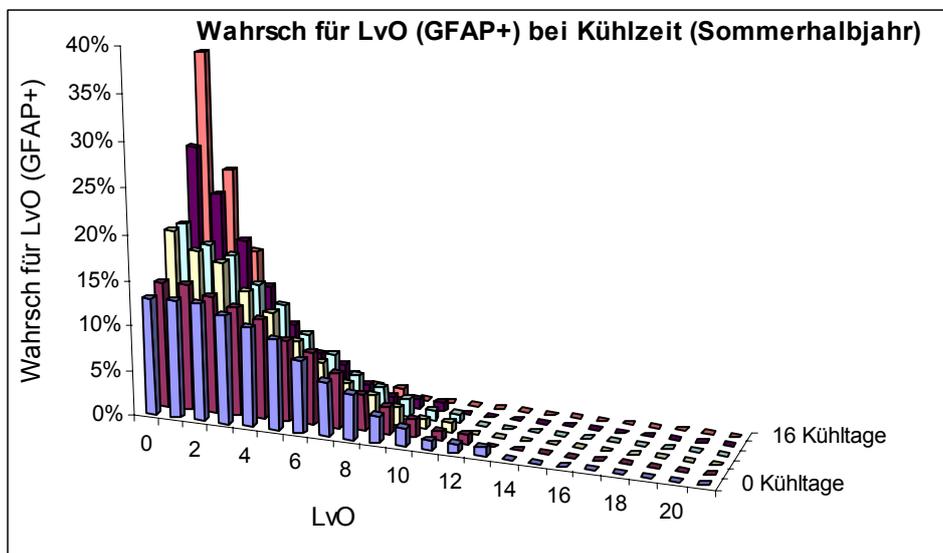
Im Sommerhalbjahr kann bei positiv gefärbten Schnitten davon ausgegangen werden, dass bei 16 Tagen Kühlzeit 40% von ihnen bis zu einem Tag LvO aufweisen, bei 0 Tagen Kühlzeit können fast 15% jeweils an den ersten 3 Tagen LvO gefunden werden. Der letzte angenommene Liegetag vor Ort befindet sich bei 16 Tagen Kühlzeit am 8. Tag, bei 0 Tagen Kühlzeit am 13. Tag. Im Winterhalbjahr bei positiver Immunreaktion können bei 0 bzw. 16 Tagen Kühlzeit in der Zeitspanne bis zu einem Tag LvO 10% bzw. 40% der Fälle angenommen werden. Der letzte positive Fall ohne Kühlung fällt auf den 16. Tag, der letzte mit 16 Tagen Kühlung auf den 9. Tag LvO.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Sommerhalbjahr eine Verteilung der Fälle an früheren LvO angenommen werden kann als im Winterhalbjahr, wo auch noch längere LvO in Frage kommen.

Gerade während der Kühlzeit lässt die immunhistochemische Anfärbarkeit nach, damit muss die Kühlzeit ebenfalls als Einflussfaktor berücksichtigt werden.

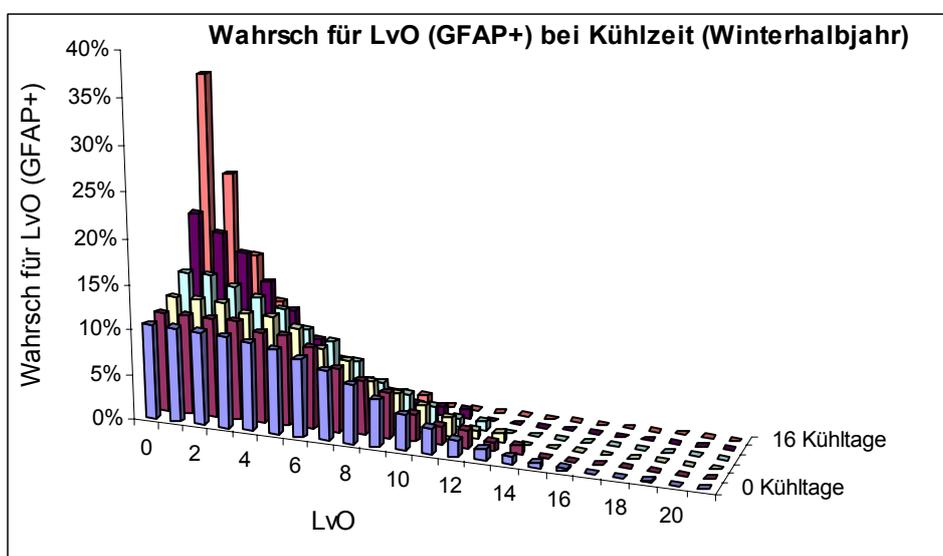
**Abbildung 14:** Angabe über die Wahrscheinlichkeit, dass eine Leiche (GFAP+) des Sommerhalbjahres, mit einer Kühlzeit von 0, 1, 2, 4, 8 oder 16 Tagen zuvor, LvO Tage am Fundort gelegen ist (absolute Angaben - Modellvorhersage bezogen auf alle Leichen des Institutes).

- Wahrsch für LvO (GFAP+) bei 0 Kühltagen
- Wahrsch für LvO (GFAP+) bei 1 Kühltag
- Wahrsch für LvO (GFAP+) bei 2 Kühltagen
- Wahrsch für LvO (GFAP+) bei 4 Kühltagen
- Wahrsch für LvO (GFAP+) bei 8 Kühltagen
- Wahrsch für LvO (GFAP+) bei 16 Kühltagen



**Abbildung 15:** Angabe über die Wahrscheinlichkeit, dass eine Leiche (GFAP+) des Winterhalbjahres, mit einer Kühlzeit von 0, 1, 2, 4, 8 oder 16 Tagen zuvor, LvO Tage am Fundort gelegen ist (absolute Angaben - Modellvorhersage bezogen auf alle Leichen des Institutes).

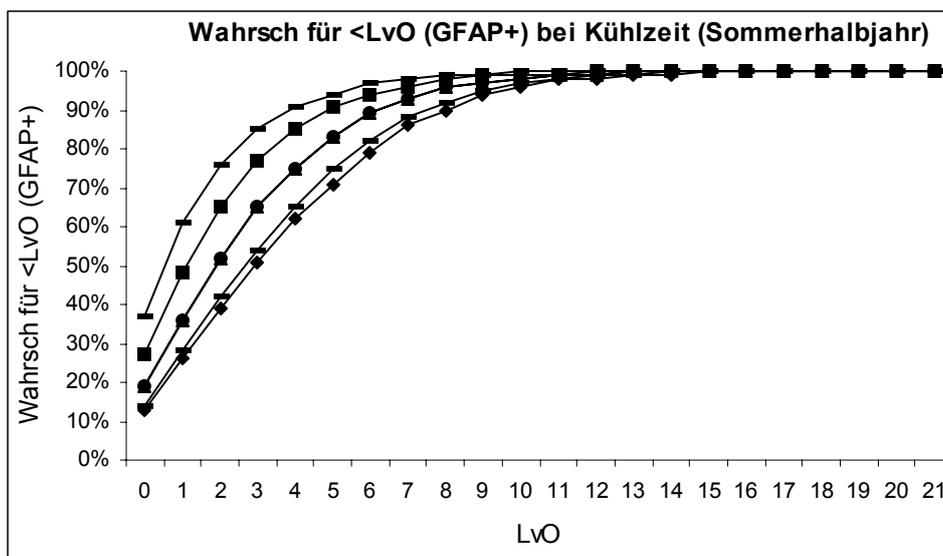
- Wahrsch für LvO (GFAP+) bei 0 Kühltagen
- Wahrsch für LvO (GFAP+) bei 1 Kühltag
- Wahrsch für LvO (GFAP+) bei 2 Kühltagen
- Wahrsch für LvO (GFAP+) bei 4 Kühltagen
- Wahrsch für LvO (GFAP+) bei 8 Kühltagen
- Wahrsch für LvO (GFAP+) bei 16 Kühltagen



Die erwartete kumulative Verteilung von Fällen (GFAP+) in Abhängigkeit der LvO ist in Abbildung 16 für das Sommerhalbjahr und in Abbildung 17 für das Winterhalbjahr dargestellt. Die Kurvenscharen sind abhängig von der vorausgegangenen Kühlzeit.

**Abbildung 16:** Aus den Kurven lässt sich ablesen welcher Anteil/wie viel Prozent der Leichen (GFAP+) mit Todeszeitpunkt im Sommerhalbjahr und Kühlzeiten von 0, 1, 2, 4, 8 und 16 Tagen zuvor, sich im Zeitraum unterhalb eines bestimmten Tages (LvO) befinden.

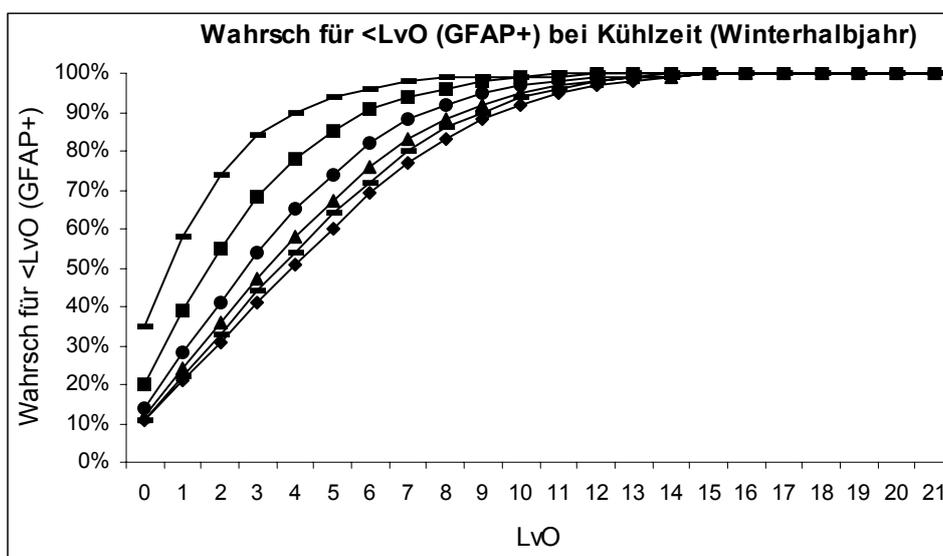
- ◆— Wahrsch für <LvO (GFAP+) bei 0 Kühltagen
- Wahrsch für <LvO (GFAP+) bei 1 Kühltag
- ▲— Wahrsch für <LvO (GFAP+) bei 2 Kühltagen
- Wahrsch für <LvO (GFAP+) bei 4 Kühltagen
- Wahrsch für <LvO (GFAP+) bei 8 Kühltagen
- Wahrsch für <LvO (GFAP+) bei 16 Kühltagen



Bei einer im Sommerhalbjahr gefundenen Leiche (GFAP+), die nicht gekühlt war, kann mit 90%-iger Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass sie  $\leq 8$  Tage (LvO) gelegen hat (50%:  $\leq 3$  Tage). Wenn unter gleichen Umständen die Leiche 16 Tage gekühlt wurde, kann mit über 90%-iger Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass sie  $\leq 4$  Tage (LvO) gelegen hat (50%:  $< 1$  Tag), s. Abb. 16.

**Abbildung 17:** Aus der Kurve lässt sich ablesen welcher Anteil/wie viel Prozent der Leichen (GFAP+) mit Todeszeitpunkt im Winterhalbjahr und Kühlzeiten von 0, 1, 2, 4, 8 und 16 Tagen zuvor, sich im Zeitraum unterhalb eines bestimmten Tages (LvO) befinden.

- ◆— Wahrsch für <LvO (GFAP+) bei 0 Kühltagen
- Wahrsch für <LvO (GFAP+) bei 1 Kühltag
- ▲— Wahrsch für <LvO (GFAP+) bei 2 Kühltagen
- Wahrsch für <LvO (GFAP+) bei 4 Kühltagen
- Wahrsch für <LvO (GFAP+) bei 8 Kühltagen
- Wahrsch für <LvO (GFAP+) bei 16 Kühltagen



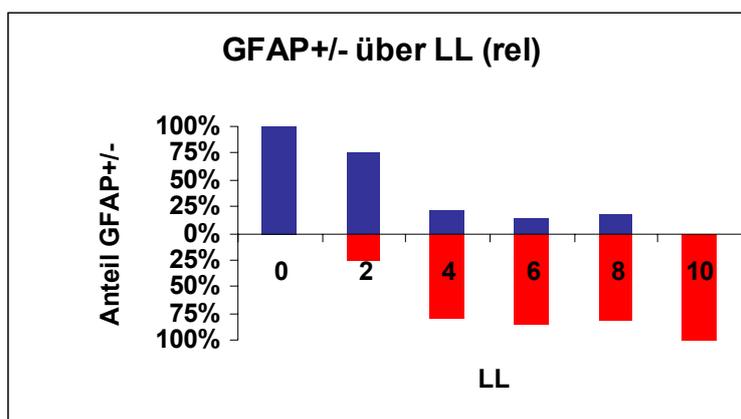
Liegt der Todeszeitpunkt einer Leiche (GFAP+) im Winterhalbjahr und berücksichtigt man wiederum die vorangegangene Kühlzeit, zeigen sich die Wahrscheinlichkeiten der LvO wie in Abb. 17 abgebildet: keine Kühlzeit – 90%-ige Anfärbewahrscheinlichkeit bei  $\leq 9$  Tagen LvO, 50%-ige  $\leq 4$  Tagen LvO, bei 16 Tagen Kühlzeit liegt die 90%-ige Wahrscheinlichkeit bei 4 Tagen LvO, die 30%-ige bei 0 Tagen LvO.

### 3.2 Tierisches GFAP

Die lichtmikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse wurde hier nach denselben Kriterien erhoben wie bei den Humanpräparaten. Negativkontrollen wurden ebenfalls durchweg negativ bewertet.

Die Ergebnisse werden im gesamten (Abbildung 18) und aufgeteilt nach Jahreszeit (Frühling, Sommer, Herbst und Winter) und Liegeort (im Innenraum / im Freien) in Blockdiagrammen (Abbildung 19) dargestellt.

**Abbildung 18:** Ergebnisdiagramm der GFAP-Anfärbbarkeit von Mäusekadavern (relative Angaben über die Liegezeit LL nach Todeseintritt).



Am 2. Tag treten zum ersten Mal negative Fälle auf. Ihr Wert erhöht sich vom 4. bis 8. Tag auf  $\approx 75\%$ , am 10. Tag sind 100% erreicht sind.

Ein Vergleich des Diagramms aller Tierkadaver (Abb. 18) mit Abbildung 2, in der alle humanen Fälle zusammengefasst sind, ergibt nur grundlegende Gemeinsamkeiten, wie der Abfall der positiven Anfärbbarkeit nach 100%-iger Anfärbbarkeit auf 100%-ige Nichtanfärbbarkeit. Engere Parallelen im Verlauf können nicht genannt werden. Auffällig ist, dass der Abfall der Anfärbbarkeit in Abbildung 2 langsamer verläuft, wobei er praktisch nicht unter 50% sinkt. Nach positiven Werten zwischen 75% und 50% schließt sich direkt die 100%-ige

Nichtanfärbbarkeit an, wohingegen der Abfall der Anfärbbarkeit über 75% auf Werte unter 25% sinkt, bevor die komplette Nichtanfärbbarkeit eintritt.

**Abbildung 19:** Ergebnisdiagramm der GFAP-Anfärbbarkeit von Mäusekadavern (relative Angaben über die Liegezeit LL nach Todeseintritt).

Abb. 19a Ergebnisse Frühjahr, Fälle mit Lagerung im Freien.

Abb. 19b Ergebnisse Frühjahr, Fälle mit Lagerung im Innenraum.

Abb. 19c Ergebnisse Sommer, Fälle mit Lagerung im Freien.

Abb. 19d Ergebnisse Sommer, Fälle mit Lagerung im Innenraum.

Abb. 19e Ergebnisse Herbst, Fälle mit Lagerung im Freien.

Abb. 19f Ergebnisse Herbst, Fälle mit Lagerung im Innenraum.

Abb. 19g Ergebnisse Winter, Fälle mit Lagerung im Freien.

Abb. 19h Ergebnisse Winter, Fälle mit Lagerung im Innenraum.

Abb. 19a:

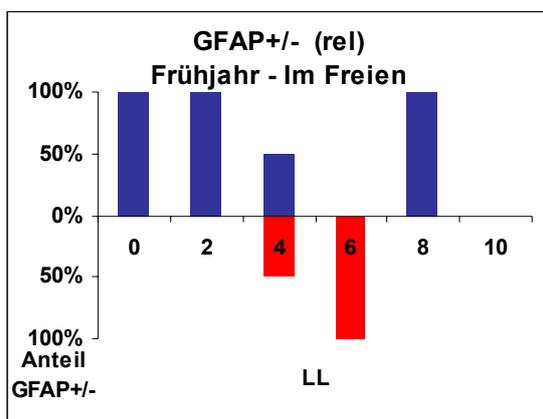


Abb. 19b:

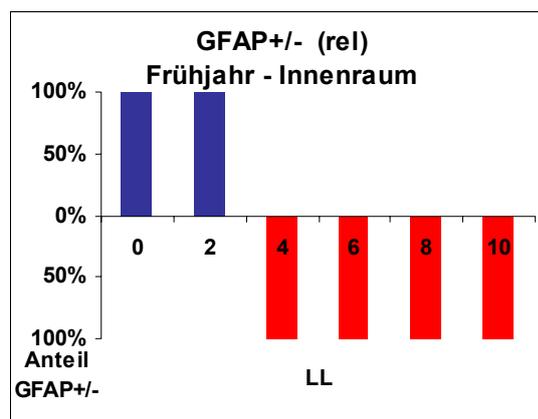


Abb. 19c:

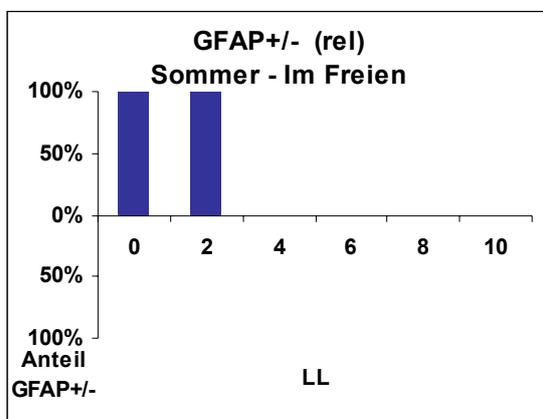


Abb. 19d:

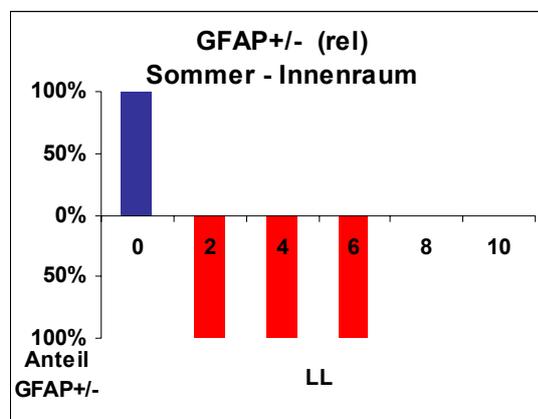


Abb. 19e:

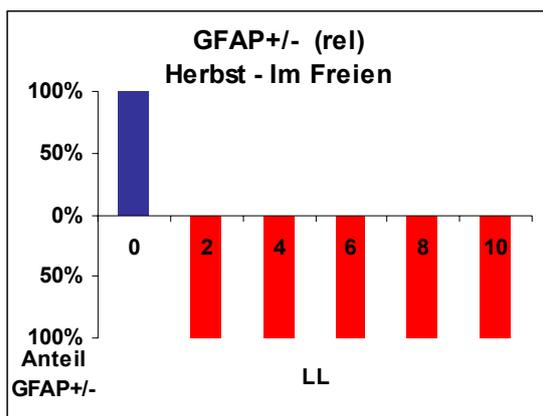


Abb 19f:

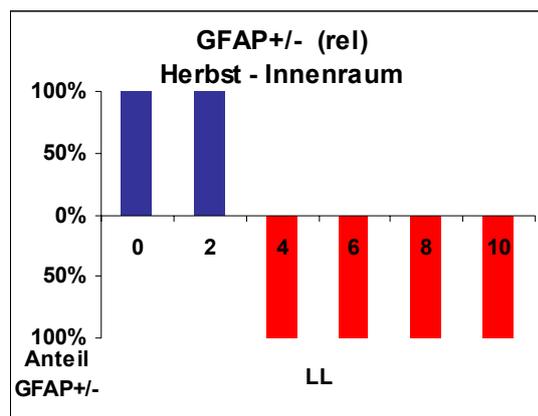


Abb. 19g:

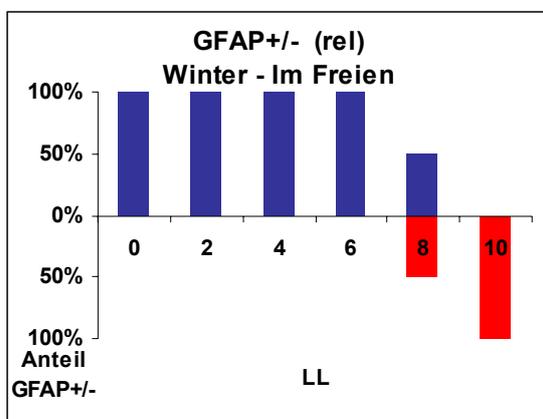
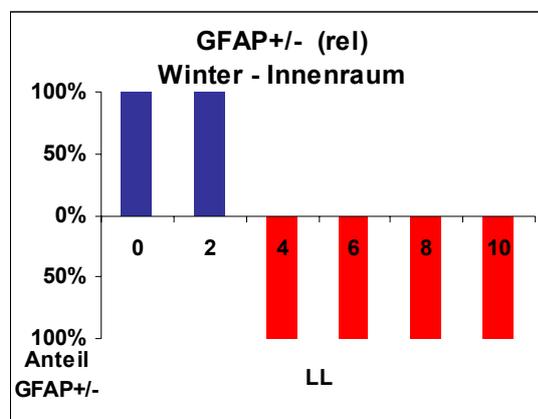


Abb 19h:



Bei den Tierkadavern, die im Innenraum ausgelegt waren, ergibt sich in jeder Jahreszeit ein eindeutiger Umschlagpunkt von anfärbbar zu nicht mehr anfärbbar. Im Sommer liegt dieser 2 Tage vor dem Umschlagpunkt, der sich bei den anderen drei Jahreszeiten ergibt (nach Tag 0 bzw. nach Tag 2). Es ist also davon auszugehen, dass die Temperatur mit einer eventuellen Sonneneinstrahlung einen bemerkbaren Einfluss nimmt, der sich hier in der Differenz von 2 Tagen niederschlägt.

Die Diagramme bei der Lagerung der Kadaver im Freien ergeben jeweils bei weitem nicht so harmonische und eindeutige Bilder. Das Diagramm der Jahreszeit Herbst lehnt sich in seinem Verlauf an das der Fälle des Sommers im Innenraum an. Die eindeutigste Aussage kann hier aus dem Diagramm des Winters abgelesen werden: kühle Temperaturen lassen einen Umschlag zur Nichtanfärbbarkeit erst ab dem 8. bzw. 10. Tag zu.

Madenfraß trat in den Jahreszeiten Frühling und Sommer auf. Während er sich noch im Frühling auf Kadaver im Freien nach 8 Tagen beschränkte, konnten im Sommer nur noch wenige Gehirne asserviert werden. Im Freien stellte sich eine Skelettierung schon nach 2 Tagen ein, wohingegen eine Asservierung bei Kadavern im Innenraum bis zum 6. Tag möglich war.

Vergleicht man die Ergebnisdiagramme der Einflussfaktoren der Tierkadaver (Abb. 19a-h) mit denen der Leichen (Abb. 3a/b und Abb. 4a/b/c/d), können grundlegende Gemeinsamkeiten genannt werden. Die mehr oder weniger stark ausgeprägte Tendenz zu negativen Ergebnissen ist immer gegeben. Eindeutig unterschiedliche Verlaufskurven der Anfärbbarkeit bzw. Nichtanfärbbarkeit von GFAP, ergeben sich jeweils über die Zeit p. m. in der warmen- und kalten Jahreszeit. Der Verlauf der Diagramme von Fällen im Innenraum stellt sich in beiden Versuchsreihen harmonischer und gleichmäßiger dar.

## **4 Diskussion**

In dieser Studie zum Themengebiet der Todeszeitbestimmung wurde an 498 humanen Gehirnschnitten untersucht, wie lange nach Eintritt des Todes GFAP in Astrocyten immunhistochemisch nachgewiesen werden kann. Das Ziel dieser Methode ist Gerichtsmediziner bei der Todeszeiteinschätzung von Leichen mit längerer Liegezeit (ab 3 bis 4 Tagen p. m.) zu unterstützen und bessere Eingrenzungen zu ermöglichen. Zusätzlich wurde untersucht welchen Einfluss der Todeszeitpunkt (Sommer- / Winterhalbjahr) und der Fundort (im Innenraum / im Freien) auf die Anfärbbarkeit nimmt, und inwieweit die gesonderte Berücksichtigung der gekühlten Lagerungszeit von Leichen, nach ihrem Auffinden, zu einer weiteren Verbesserung bei der Todeszeitbestimmung führen kann.

### **4.1 Histomorphologie**

Aus dem Kollektiv derjenigen Leichen, bei denen Gehirnmaterial asserviert wurde, und deren Todeszeitpunkt kriminalpolizeilich auf 1 Tag genau bestimmt werden konnte, wurden per Zufallsprinzip 498 Leichen ausgewählt und deren Gehirnschnitte angefärbt. Bei der Auswahl des Leichenkollektivs galten keine organspezifischen oder krankheitsbedingten Ausschlusskriterien.

Der Frontallappen ist ein Teil des Gehirns, das im Gerichtsmedizinischen Institut Tübingen routinemäßig asserviert wird. Mit grauer und weißer Substanz, d. h. Rinden- und Markregion, bietet er sich für die immunhistochemische Untersuchung von GFAP in Astrocyten an. Astrocyten werden dadurch definiert, dass sie GFAP enthalten. Man findet sie im gesamten Nervensystem. Sie

werden in Familien unterteilt: Faserastrocyten (weiße Substanz) und protoplasmatische Astrocyten (graue Substanz), (Prochiantz und Mallat 1988; Jacque 1991). Frontallappen wurden in 459 Fällen untersucht. Stand kein Frontallappen zur Verfügung, wurden andere Großhirnteile (31), bzw. Kleinhirn (2), Stammknoten (4), Hirnstamm (1) oder Brücke (1) zur Färbung herangezogen.

In der Literatur konnte kein Krankheits- oder Verletzungsbild gefunden werden, bei dem GFAP nicht vorhanden oder immunhistochemisch nicht anfärbbar gewesen wäre. In der Literatur wird sogar ein vermehrtes Auftreten von Astrocyten mit GFAP oder eine vermehrte immunhistochemische Reaktion bei Krankheiten oder entzündlicher Antwort (Gliose) beschrieben. Bei der Alexander Krankheit treten die sog. Rosenthal Fasern auf, die sich im Gehirn immer weiter ausbreiten. Das sind Astrocyten, die zytoplasmatische Einschlüsse mit GFAP besitzen (Namekawa et al. 2002). Bei Alzheimer konnte GFAP aus den Plaques isoliert werden, wo es lokal am Randschorf zu einem starken Anstieg der Konzentration des Proteins kommt. Ein verzögerter Abbau tritt vermutlich nicht auf (Jacque 1991). Bei Patienten mit Down Syndrom ist GFAP in unveränderter Konzentration vorhanden. Es sind andere Proteine, die hier veränderte Konzentrationen aufweisen (Becker et al. 1991). Bei allen Traumata, die Astrocyten mit betreffen, steht die Gliose mit Proliferation und Größenzunahme im Vordergrund (Eng et al. 1985; Wu und Schwartz 1998; Pekny 2001): bei Ausbildung einer Astrogliose wird GFAP vermehrt angefärbt, ohne dass die Anzahl zunimmt. Durch das Ödem der traumatisierten Struktur kommt es zu Formveränderungen, d. h. zu einer Art Aufdrehen der Proteinstruktur, wodurch mehr antigene Strukturen freigelegt werden (Eng et al. 1992). O'Callaghan beschreibt GFAP als guten – auch quantitativ auszuwertenden - Marker für toxische Schädigungen des ZNS (O'Callaghan et al. 1995).

Die Schnittführung wurde so gewählt, dass sowohl Rinden- als auch die Markregionen getroffen und gefärbt wurden. GFAP konnte bei den in Formalin asservierten Präparaten in den protoplasmatischen Astrocyten der grauen Substanz angefärbt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Studie von

Shehab (Shehab et al. 1990). Er beschreibt, dass nach der Fixation mit 4% Paraformaldehyd GFAP in protoplasmatischen Astrocyten durch Antikörperreaktionen nachgewiesen werden kann, während Acid-alcohol ein gutes Fixationsmittel für Faserastrocyten in der weißen Substanz darstellt.

Mc Lendon empfiehlt die Formalin-Fixierung. Bindungsstellen, an die sich die Antikörper binden, können hier effektiver freigelegt werden (McLendon und Bigner 1994). Eng spricht in diesem Zusammenhang sogar von einem Rückgang von GFAP-Epitopen bei Aldehyd-Fixation gegenüber der Formaldehydfixierung (Eng und Ghirnikar 1994).

Eng beschreibt in seiner Veröffentlichung weiter, dass es auch nach Eintritt des Todes durch Formveränderung des Proteins zu einer vermehrten Freilegung von Epitopen und dadurch zu einer vermehrten Anfärbbarkeit kommt (Eng und Ghirnikar 1994). Er empfiehlt daher eine qualitative Auswertung und rät von einer quantitativen ab. Als Einflussfaktoren auf die immunhistochemische Anfärbbarkeit bei humanem postmortalem Material des ZNS nennt er den Zustand des Patienten bei Todeseintritt, das Zeitintervall vom Todeszeitpunkt bis zur Autopsie und die Zeit, die während des Fixationsprozesses vergeht.

De Groot gibt eine Beschädigung der histologischen Struktur in der grauen Substanz bei Ratten bereits 12 Stunden p. m. an, während die Faserastrocyten der weißen Substanz ihre Morphologie über den gesamten untersuchten postmortalen Zeitraum behielten (De Groot et al. 1995).

Jacque spricht von einer schnellen postmortalen Degeneration des humanen GFAP (ab 20 Min. p. m. elektrophoretisch nachweisbar), (Jacque 1991). Er unterstreicht damit die schnell eintretenden Veränderungen an dem Protein, die sich auch auf die immunhistochemische Anfärbbarkeit auswirken (und damit eine qualitative Auswertung sinnvoll erscheinen lassen).

Weitere zellmorphologische Unterscheidungen bieten sich bei der lichtmikroskopischen Auswertung durch Inaugenscheinnahme aus o. g. Gründen nicht an.

## 4.2 Immunhistochemische Anfärbarkeit des GFAP

Durch Anwendung der immunhistochemischen Färbemethode konnte wie erwartet nachgewiesen werden, dass sich die Tertiärstruktur des Proteins GFAP nach Eintritt des Todes verändert. (Jacque 1991; Eng und Ghirnikar 1994; Eng et al. 2000). Die anfänglich vollständige Anfärbarkeit nahm nach dem Tod über mehrere Tage bis zur vollständigen Nichtanfärbarkeit ab. Bis einschließlich 3. Tag p. m. zeigten alle gefärbten Schnitte eine positive Immunreaktion. Ab dem 14. Tag traten ausschließlich negative Ergebnisse auf (Abb. 2). Zwischen dem 3. und 14. Tag liegt ein Zeitfenster, in dem sowohl negative als auch positive Färbeergebnisse erzielt wurden. Aus diesem Blockdiagramm lässt sich für die Todeszeitbestimmung ableiten: Bei einem positiven Färbeergebnis kann die Liegezeit bis einschließlich 13 Tage betragen, bei negativer Färbung liegt nach Todeseintritt eine Mindestliegezeit von 4 Tagen vor. Aus dem Absinken der Häufigkeit für positive Ergebnisse über die Zeit p. m. innerhalb des Zeitfensters geht außerdem hervor, dass eine kürzere Liegezeit bei positivem Ergebnis wahrscheinlicher ist.

Die Wahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Zeit p. m., GFAP durch ein positives Färbeergebnis nachzuweisen bzw. durch ein negatives immunhistochemisches Ergebnis den Zerfall des Proteins bestätigt zu sehen, ist in Abbildung 5 bzw. Abbildung 11 dargestellt. Die mit Hilfe der logistischen Regression erstellten Wahrscheinlichkeitskurven wurden auf Grundlage des Kollektivs der 498 humanen Fälle erstellt.

Um Gerichtsmedizinern Wahrscheinlichkeitsangaben über die Liegezeit einer Leiche bei eingetretenem positivem bzw. negativem Färbeergebnis zu ermöglichen, wurde berücksichtigt, dass weit mehr Leichen kurz nach ihrem Ableben gefunden werden, während eine Liegezeit über mehrere Tage hinaus dagegen seltener auftritt. Als Grundlage der Berechnung wurde die Verteilung der Liegezeit der Fälle des Institutes für Gerichtliche Medizin Tübingen herangezogen. Von dem Kollektiv wurden Leichen ausgeschlossen, bei denen der Test nicht durchführbar gewesen wäre (Tab. 1 und 2). Die Wahrscheinlichkeit für eine bestehende Liegedauer einer Leiche (in Tagen),

unter Berücksichtigung der Fundhäufigkeiten von Leichen, bei einem positiven Färbeergebnis, ist in Abb. 6 dargestellt. Für ein eingetretenes negatives Färbeergebnis gilt Abbildung 12. Bei positiver Anfärbbarkeit kann eine Wahrscheinlichkeit von 50% für die Liegezeit von 1 Tag, von 25% für 2 Tage und 10% für 3 Tage angegeben werden (Abb. 6). Die Abbildungen 7 bzw. 13 geben bei positivem bzw. negativem Färbeergebnis die kumulative Wahrscheinlichkeit für eine Liegedauer bis zu einem bestimmten Tag an. Bei positivem immunhistochemischem Ergebnis kann mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit angegeben werden, dass eine aufgefundene Leiche 4 Tage oder kürzer liegt, mit 50%-iger Wahrscheinlichkeit 1 Tag oder kürzer (Abb. 7).

In den ersten 4 Tagen p. m. ist die Wahrscheinlichkeit für die Liegedauer bei Anfärbbarkeit (Abb. 6) etwa proportional zur Häufigkeitsverteilung der Leichen (Tab. 2), (Leichen mit kurzer Liegezeit treten häufiger auf als solche mit längerer). Das drückt sich mit Likelihood-Quotient-(LQ)-Werten zwischen 1,13 und 1,69 (Tab. 5) aus. Durch den Test kann die Vorhersagewahrscheinlichkeit ab dem 5. postmortalen Tag deutlich verbessert werden. Bei positivem Testergebnis ist die Chance, dass eine Leiche 5 Tage gelegen hat doppelt so hoch wie bei unbekanntem Testergebnis ( $LQ+ = 2,07$ ), für den 9. Tag sogar 6 Mal so hoch ( $LQ+ = 6,12$ ).

Bei eingetretener negativer immunhistochemischer Färbung liegen die Werte für den LQ niedriger (Tab. 5;  $LQ \leq 0,21$ ). Unter diesen Umständen lässt sich aus Abbildung 2 die Angabe formulieren, dass die Leiche länger als 3 Tage liegt. Seit Eintritt des Todes sind mit 15%-iger Wahrscheinlichkeit höchstens 1 Tag, mit 50%-iger höchstens 7 Tage oder weniger vergangen (Abb. 13 berücksichtigt hier wiederum das vermehrte Auftreten von Leichen mit kurzer Liegezeit).

Einen deutlichen Erkenntnisgewinn bringt der Test somit bei positivem Färbeergebnis, besonders ab dem 4. Tag p. m.. Die Methode kann sich hier Todeszeitbestimmungsmethoden des frühen postmortalen Intervalls (z. B. Druckveränderung von Totenflecken (Kaatsch et al. 1994), sowie temperaturgestützten Verfahren wie Rektaltemperatur-Todeszeit-Nomogramm-

Methode (Henssge 1988) oder Triple-Exponential Formulae (Al Alousi et al. 2001)) anschließen, um eine Liegezeit bis zum 14. Liegetag (vollständige Nichtanfärbbarkeit) abzudecken. Entomologische Bestimmungsmethoden (Reiter 1984; Marchenko 2001; Grassberger und Reiter 2001) und Todeszeitbestimmungen mit MRT (Ith et al. 2002) können zur weiteren Todeszeitbestimmung dienen oder zur Absicherung überlappend eingesetzt werden.

Ith geht mit der magnetresonanzspektroskopischen Untersuchung von Schafsköpfen zur Todeszeitbestimmung bis zu einer Liegezeit von 3 bzw. 4 Wochen p. m. neue Wege (Ith et al. 2002). Bis zu 15 Tagen nach Abtötung wurden die Schafsköpfe bei Raumtemperatur mehrfach untersucht. Das Ergebnis: Metabolitenkonzentrationen verändern sich im Lauf der Zeit nach Abtötung charakteristisch. In der späten postmortalen Phase sind die meisten Konzentrationen stark reduziert, 3 Peaks mit Metaboliten die in vivo nicht nachgewiesen werden können treten im Spektrum neu auf. An ausgesuchten Humanuntersuchungen konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden und damit die Übertragbarkeit der Methode in großen Teilen bewiesen werden. Humanstudien in größerem Umfang, sowie forensisch verwertbare Untersuchungen unter Berücksichtigung der Temperatur, die zu einem veränderten postmortalen Zerfallsprozess führt, stehen noch aus.

Hier dargestellt ist eine ebenfalls interessante neue Methode zur Todeszeitbestimmung, die ein Intervall vom 3. Tag bis zu 3 Wochen abdecken kann, die sich jedoch noch im Versuchsstadium befindet. Bis sie für Gerichtsmediziner zum Einsatz zur Verfügung steht, bedarf es wohl noch weiterer Datenerhebungen.

Bisher werden hauptsächlich entomologisch Untersuchungen zur Todeszeitbestimmung bei längerer Liegezeit von Leichen eingesetzt. Zur Bestimmung kann zum einen die Analyse der gestaffelten Besiedelung genutzt werden, und zum anderen die Identifizierung und Altersbestimmung der vorgefundenen Insekten. Ein postmortales Intervall von 4-6 Wochen lässt sich

nach Angabe von Niess bei optimaler Datenlage noch auf den Tag genau bestimmen, während noch längere Liegezeiten auf Zeitfenster eingegrenzt werden können (Niess et al. 2001). Entomologische Bestimmungsmethoden sind aufgrund spezieller Flora und Fauna regional unterschiedlich zu bewerten. Da die Entwicklung der Insekten stark temperaturabhängig ist, ist die Temperatur der Parameter - die bei diesen Methoden in erster Linie berücksichtigt werden muss – woraus sich auch eine jahreszeitliche Abhängigkeit ergibt. Niess beschreibt, dass eine Insektenbesiedelung über die kalte Jahreszeit im Großraum Frankfurt a. M. durchaus auftritt, allerdings nur bei 16% der untersuchten Fälle (Niess et al. 2001). Schröder beschreibt, dass auch bei Wohnungsleichen ein spezifisches Insektenspektrum (wenn auch verschmälert) sowohl im Winterhalbjahr als auch im Sommerhalbjahr auftritt, das zur Todeszeitbestimmung genutzt werden kann (Schröder et al. 2001).

Zur Altersbestimmung von Insekten können die jeweiligen morphologischen Entwicklungsstadien herangezogen werden – werden z. B. Maden beurteilt, geschieht dies über ihre Längenbestimmung und die Beurteilung der Darmtraktfüllung. Um die erhobenen Daten zur Todeszeitbestimmung nutzen zu können, muss die Entwicklungsgeschwindigkeit ermittelt werden. Da diese stark temperaturabhängig ist, wurden Diagramme entwickelt, aus denen sich das postmortale Intervall temperaturabhängig ermitteln lässt. Reiter veröffentlichte 1984 seine Ergebnisse über die Temperaturabhängigkeit der Darmfüllung und der Körperlänge bei Maden der Art *Callivora vicina* (Reiter und Hajek 1984). Unter 3 verschiedenen Temperaturbedingungen wurden die Maden aufgezüchtet und die Darmtraktfüllung während ihrer Entwicklung beobachtet. Nach Erreichen der Maximallänge entleeren die Maden den Darmtrakt vor ihrer Verpuppung. Diese Veränderungen können, unter Berücksichtigung der Temperatur zur Todeszeitbestimmung genutzt werden. Im selben Jahr veröffentlichte Reiter einen weiteren Artikel zum Wachstumsverhalten der oben genannten Schmeißfliegengattung (Reiter 1984). Aus einem Isomegalendiagramm kann, anhand der durchschnittlichen Madenlänge und der ermittelten Umgebungstemperatur, das Larvenalter bestimmt werden. Grassberger et al. entwickelten für die Fliege *Lucilia sericata* ebenfalls ein

Isomegalendiagramm, mit dem das Alter zwischen Schlüpfen und dem Erreichen der Maximallänge temperaturabhängig ermittelt werden kann. In einem weiteren Isomorphen-Diagramm sind alle Entwicklungsstadien in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Ermittelt werden kann hier der Zeitpunkt der Eiablage (Grassberger und Reiter 2001).

Marchenko führte groß angelegte Feldstudien durch und untersuchte die Verwesung von Leichen unter verschiedenen Bedingungen (Marchenko 2001). Er kommt zu dem Ergebnis, dass zur jahreszeitlichen Bestimmung bzw. Todeszeitbestimmung (der Zeitpunkt an dem die Leiche am Fundplatz abgelegt wurde) ebenso wie zur Feststellung, ob die Leiche bewegt wurde, und zur Hilfe der Rekonstruktion des Ortes, von dem die Leiche verschleppt wurde, entomologische Untersuchungen eingesetzt werden können.

Entomologische Bestimmungsmethoden helfen oft dort weiter, wo aufgrund der langen Liegezeit keine anderen Methoden mehr angewendet werden können. Die Bestimmungsmethoden wurden hier immer weiter verfeinert, so dass sie bei der Todeszeitbestimmung über Tage und Wochen hinaus wertvolle Hinweise liefern können. Alle entomologischen Methoden sind stark temperatur- und klimaabhängig, so dass auch hier die Erfassung der Einflussfaktoren eine große Rolle spielt. Gute Ergebnisse bei der Eingrenzung des Todeszeitpunktes können jedoch noch über Wochen hinaus getroffen werden, was die Methode für Gerichtsmediziner wertvoll macht.

Der Vorteil von immunhistochemischen Untersuchungsmethoden zur Todeszeitbestimmung ist darin zu sehen, dass zahlreiche Proteine unterschiedlicher Organe und somit verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung stehen. Die Immunhistochemie kann sich bei Bedarf nach der routinemäßigen Asservation von Organgewebe anschließen und kann auch noch nach vielen Jahren zuverlässig angewandt werden. Durch Kombination von Ergebnissen verschiedener Proteine aus unterschiedlichen Organen kann die Todeszeitbestimmung weiter eingegrenzt und abgesichert werden. Stehen Laborräume zur Verfügung erscheint die Immunhistochemie zeitlich, technisch und somit auch finanziell weit weniger aufwendig als z. B. die

magnetresonanzspektroskopische Untersuchung (mit hohem technischem und finanziellem Aufwand) oder die Entomologie (mit nicht geringem zeitlichen Aufwand der Aufzucht und Typisierung der Insekten durch Spezialisten).

Die magnetresonanzspektroskopische Untersuchung wäre allein schon bei Fehlen des Schädels nicht durchführbar.

Entomologische Untersuchungen stützen sich auf Insekten mit ihren Entwicklungsstadien, die nicht zuverlässig an allen Leichenfundorten angetroffen werden.

### **4.3 Einflussfaktoren auf die Anfärbarkeit des GFAP**

Mit dieser Studie wurde versucht die Einflussfaktoren Temperatur (und Fundort) sowie Luftfeuchtigkeit zu berücksichtigen und deren Einfluss bei der Methode der immunhistochemischen Anfärbarkeit zu beschreiben. Aus dem Leichenkollektiv wurden Fälle mit Todeszeitpunkt im Sommer- und Winterhalbjahr und zusätzlich nach Fundort im Innenraum und im Freien differenziert und in Untergruppen gegliedert.

Von einer weiteren Differenzierung wurde Abstand genommen, da mit Todeszeitpunkt und Fundort alle wichtigen Haupteinflussfaktoren berücksichtigt wurden. Die Methode bleibt so außerdem flexibel, einfach und universell einsetzbar.

Der unterschiedliche zeitliche Verlauf der Anfärbarkeit im Winter- bzw. Sommerhalbjahr war statistisch signifikant (Tab. 4:  $p=0,0065$ ).

Aus beiden Unterdiagrammen zur GFAP-Anfärbarkeit im Sommer- und Winterhalbjahr (Abb. 3a,b) geht hervor, dass alle Leichen mit einer Liegezeit kürzer als 4 Tage anfärbbar waren. Ab dem 14. Tag fiel die Anfärbarkeit dagegen ausschließlich negativ aus. Die Grenzen des Zeitfensters (4. bis einschließlich 13. Tag p. m.) sind somit gleich wie die des Gesamtkollektivs (Abb. 2).

Im Zeitfenster zeigt der Verlauf dagegen Unterschiede: Im Sommerhalbjahr nimmt der Anteil der positiv gefärbten Leichen stetig ab, während im

Winterhalbjahr die Häufigkeit für positiv gefärbte Fälle zwischen dem 4. und einschließlich 13. Tag p. m. auf relativ konstantem Niveau zwischen 60% und 100% ohne klaren Trend schwankt. Der Umschlag zur vollständigen Nichtanfärbbarkeit fällt nach dem 13. Tag p. m. abrupter aus. Bei einem positiv gefärbten Schnitt ist also die Wahrscheinlichkeit einer längeren Liegezeit im Winter höher. Im Sommerhalbjahr geht der Verwesungsprozess wohl teilweise schneller vonstatten.

Bei zusätzlicher Unterscheidung der im Innenraum gefundenen Leichen (Abb. 4b,d) zeigen sich bezüglich der Anfärbbarkeit sowohl im Winter- als auch im Sommerhalbjahr die gleichen Grenzen (4. bzw. 13. Tag p. m.). Die Häufigkeitsverteilung für die Anfärbbarkeit im Zeitfenster verläuft ähnlich wie im Sommer- bzw. Winterhalbjahr (Abb. 3a,b).

Deutlichere Unterschiede der Häufigkeitsverteilungen bei der Anfärbbarkeit finden sich bei Leichen mit Fundort im Freien (Abb. 4a,c). Im Zeitfenster des Sommerhalbjahres (Abb. 4a) ist wiederum eine Tendenz bei stetigem und klarem Abfall zu erkennen. Das Zeitfenster stellt sich hingegen um 5 Tage verkürzt dar (vollständige Nichtanfärbbarkeit schon ab dem 8. Tag p. m.). Im Winterhalbjahr (Abb. 4c) treten die ersten negativen Fälle dagegen ab dem 6. Tag p. m. auf, das Fenster ist hier um 3 Tage verkürzt. Die Häufigkeitsverteilung der Anfärbbarkeit im Zeitfenster lehnt sich an die schon bekannte des Winterhalbjahres an.

Aus den Wahrscheinlichkeitskurven für die Anfärbbarkeit über die postmortale Leichenliegezeit mit 4 Gruppenunterscheidungen (Todeszeitpunkt und Fundort) gehen Unterschiede im Verlauf deutlich hervor (Abb. 8). Für die 90%-ige Anfärbwahrscheinlichkeit ergeben sich nach der Modellanpassung für das Winterhalbjahr / im Freien bzw. im Innenraum Werte bis zu 8 Tagen bzw. bis zu 5 Tagen, gefolgt vom Sommerhalbjahr / Innenraum und im Freien mit Werten jeweils bis zu 3 Tagen. Eine 50%-ige Anfärbwahrscheinlichkeit kann im Winterhalbjahr / im Innenraum bzw. im Freien bis zu einer Liegezeit von 13 bzw. 11 Liegetagen am längsten angenommen werden. Wesentlich kürzer, mit einer Liegezeit von 8 bzw. 6 Tagen, stellt sich das Zeitintervall für ein zu 50%

wahrscheinliches positives Färbeergebnis im Sommerhalbjahr / im Innenraum bzw. im Freien dar.

Im Winterhalbjahr können mehr positiv gefärbte Fälle auch mit längerer Liegezeit erwartet werden als im Sommerhalbjahr. Die sigmoidal verlaufenden Kurven mit Fundort im Innenraum liegen dabei näher am Durchschnitt. Bei Fundort im Freien treten zwischen den Wahrscheinlichkeitskurven die größten Differenzen (von 5 bzw. 7 Tagen bei 90 bzw. 50%-iger Anfärbewahrscheinlichkeit) auf. Extremere Liegezeiten oder größere Abweichungen bei Wahrscheinlichkeitsangaben oder Voraussagen müssen bei Leichenfund im Freien mit in Betracht gezogen werden. Die sigmoidal verlaufende Wahrscheinlichkeitskurve für ein positives Ergebnis im Sommerhalbjahr, bei Fund der Leiche im Freien, fällt in ihrem Verlauf am steilsten ab und lässt damit die präziseste Eingrenzung zur Leichenliegezeit zu.

Um eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit treffen zu können, wie viele Tage eine Leiche (bei positiv gefärbtem Schnitt) mit entsprechendem Todeszeitpunkt und Fundort nach Eintritt des Todes liegt (es wird berücksichtigt, dass die meisten Leichen nach kurzer Liegezeit aufgefunden werden), wurden die Ergebnisse der 4 Gruppen auf alle Leichen des Institutes bezogen (auf die die GFAP-Färbung anwendbar ist). Die Differenzen pro Tag p. m., die durch die Einflussfaktoren Fundort, Todeszeitpunkt und ihrer Kombinationen auftreten, zeigen eine Differenz von bis zu 4 Prozentpunkten am 1. Tag und bis zu 2 Prozentpunkten an den weiteren Tagen p. m. (Abb. 9). Aus der kumulativen Darstellung (Abb. 10) wird eine klare Differenz zwischen den Kurvenverläufen in Größenordnung von 3 – 5 Prozentpunkten nur zwischen dem 2. und 5. Tag p. m. sichtbar.

Die Ermittlung der Odds Ratios (OR) zeigt, dass die Chance auf Anfärbbarkeit im Sommerhalbjahr nur 0,34 mal so groß ist wie im Winterhalbjahr (95% Konfidenzintervall von 0,19 -0,61). Dass die Anfärbbarkeit im Freien schneller sinkt als im Innenraum (OR = 0,93), kann man bei einem 95% Konfidenzintervall von 0,44 – 2,08 nicht sicher behaupten. Dieses Ergebnis

bestätigt, dass das Halbjahr (Winter- / Sommerhalbjahr) bei der Vorhersage zur Todeszeit Berücksichtigung finden sollte.

Die Dauer der Liegezeit nach Todeseintritt nimmt entscheidenden Einfluss auf die Anfärbarkeit des GFAP. Werden keine weiteren Gegebenheiten berücksichtigt, erhält man bei Wahrscheinlichkeitsangaben zur Todeszeitbestimmung solide Ergebnisse. Verfeinert werden kann die Aussage zwischen dem 3. und einschließlich 13. Tag p. m. bei Berücksichtigung des Todeszeitpunktes. Die geringere Chance auf Anfärbarkeit im Sommerhalbjahr konnte mit einem OR von 0,34 bestätigt werden. Die herausgearbeiteten Unterschiede könnten in erster Linie auf die Temperatur zurückgeführt werden.

Der Einfluss der Temperatur ist vermutlich auch für die Unterschiede an verschiedenen Fundorten verantwortlich. Auch ähnliche Verläufe der Wahrscheinlichkeitskurven im Innenraum sowohl im Winter als auch im Sommer können durch die Temperatur erklärt werden.

Beheizte Räume während des Winterhalbjahres scheinen nicht so viel Einfluss zu nehmen wie angenommen werden kann. Im Sommerhalbjahr kann direkte Sonneneinstrahlung oder das vermehrte Öffnen von Fenstern als Erklärung dienen. Werden Leichen im Freien aufgefunden, nimmt die Temperatur einen stärkeren Einfluss auf die immunhistochemische Anfärbarkeit. Abweichungen vom Durchschnitt müssen hier im Gegensatz zu Leichen mit Fund im Innenraum in stärkerem Maße in Betracht gezogen werden.

Temperatur, Sonneneinstrahlung, Luftbewegung und Leichenexposition (Erdgrab/Oberfläche) sind die meistgenannten Einflussfaktoren auf den postmortalen Zerfallsprozess (Weinmann 1928; Van de Voorde und Van Dijck 1982; Reiter 1984; Henssge 1988; Mann et al. 1990; Marchenko 2001; Grassberger und Reiter 2001). Eine Gewichtung von Einflussfaktoren nahm Mann in seiner Veröffentlichung von 1990 vor. Über einen Zeitraum von 10 Jahren wurde diese große Feldstudie durchgeführt. Leichen wurden auf einem Versuchsgelände (keine Standardbedingungen wie im Labor) ausgelegt und ihr

Zerfall studiert, um den Einfluss verschiedener Variablen bewerten zu können. Eine Gewichtungsskala mit Werten von 1 bis 5 wurde erstellt. Als Einflussfaktoren mit stärkster Gewichtung werden Temperatur, Insektenexposition, Erdgrab (und dessen Tiefe), gefolgt von Nagern und fleischfressenden Wildtieren, Verletzungen und Luftfeuchtigkeit genannt. Mit kleinem Einfluss: Regen, Körpergewicht und Ausmaße, Balsamierung, Bekleidung, Beschaffenheit der Liegefläche und Boden-pH.

Die zitierte Literatur bestätigt die Ergebnisse dieser Studie zu den Einflussfaktoren. Die Temperatur nimmt unter allen Einflussfaktoren den größten Einfluss auf den postmortalen Degenerationsprozess des GFAP ein. In unserer Studie wird sie zusammen mit der Luftfeuchtigkeit bei der Untergruppierung nach dem Todeszeitpunkt (Winterhalbjahr / Sommerhalbjahr) berücksichtigt und in aufgegliederten Blockdiagrammen und Wahrscheinlichkeitskurven dargestellt. Die geschützte Lage der Leiche durch Berücksichtigung des Fundortes (im Innenraum / im Freien) umfasst – natürlich in individuellem Umfang – die Einflussfaktoren Insekten- / Wildtierexposition, Luftbewegung, Sonneneinstrahlung, Regen und auch indirekt wieder die Temperatur.

Bei zahlreichen Methoden zur Todeszeitbestimmung wurde versucht, die o. g. Einflussfaktoren zur Todeszeitbestimmung zu erfassen und entsprechend zu berücksichtigen:

Bei entomologischen Verfahren zur Todeszeitbestimmung wird zum einen die Artenvielfalt mit der etappenweisen Besiedelung berücksichtigt, zum anderen die Länge und Darmfüllung von Maden im Zusammenhang mit der Umgebungstemperatur. Reiter (Reiter 1984) bietet zur Todeszeitbestimmung ein Isomegalendiagramm an, dem das Wachstumsverhalten der Schmeißfliege *Calliphora vicina* zugrunde liegt. Anhand der durchschnittlichen Madenlänge und der Umgebungstemperatur lässt sich hier die postmortale Zeit ablesen. Um bei schwankender Temperatur mögliche Fehlbestimmungen zu umgehen, bietet sich bei dieser Methode eine schrittweise Rückrechnung in Anlehnung an die jeweilige Temperatur an. Grassberger (Grassberger und Reiter 2001)

entwickelte zu der Schmeißfliege *Lucilia sericata* ein Isomegalen- und ein Isomorphendiagramm. Die Entwicklung wurde unter 10 verschiedenen Temperaturbedingungen studiert. So kann anhand der Madenlänge und der Temperatur die Zeit des Schlüpfens, und anhand des morphologischen Entwicklungsstadiums und der Temperatur der Zeitpunkt der Eiablage rekonstruiert werden.

Van de Voorde und Van Dijck (Van de Voorde und Van Dijck 1982) führten eine Todeszeiteingrenzung im späten postmortalen Intervall mit Hilfe der Analyse des Pilzwachstums durch. Unter der am Leichenfundort ermittelten Temperatur wurden Pilzkulturen angezüchtet, bis sie eine vergleichbare Größe mit dem am Fundort sichergestellten Material aufwiesen.

Die Zerfallsrate von DNA nutzte Perry (Perry, III et al. 1988) zur Todeszeitbestimmung. DNA wurde aus humanen Rippenknochen gewonnen und bei unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit inkubiert – eben diese unterschiedliche Luftfeuchtigkeit schien zum einen Einfluss auf das Ergebnis bei der Gelelektrophorese zu nehmen. Bei Arbeit unter verschiedenen Temperaturbedingungen zeigten sich zum anderen Unterschiede bei den Ergebnissen. Durch Radiomarkierung konnten die Ergebnisse in Autoradiogrammen sichtbar gemacht werden.

Henssge (Henssge 1988) entwickelte die Nomogramm-Methode für das frühe postmortale Intervall. Mit ermittelter Umgebungs- und Rektaltemperatur und Einbeziehung des Körpergewichtes sowie Korrekturfaktoren (für trockene / nasse Umgebung, Luft- / Wasserbewegung und Bedeckung / Bekleidung der Leiche) lässt sich dann der Todeszeitpunkt aus dem Nomogramm ablesen. Nicht angewendet werden sollte diese Methode bei starker Wärmestrahlung oder Kühlung, bei Verdacht auf Unterkühlung und Verdacht auf Verschleppung der Leiche, da diese Einflüsse nicht mehr ausgeglichen und falsche Angaben zur Todeszeit daraus gefolgert werden können.

Wasserleichen werden i. d. R. separat betrachtet (Reh et al. 1977; Kahana et al. 1999). Wassertemperatur, Strömung / Wasserbewegung und Tier- / Keimbesiedelung können als Einflussfaktoren auf den Zerfallsprozess unter Wasser genannt werden. Reh berücksichtigt in seiner Veröffentlichung von

1977 die Wassertemperatur als stärksten Einflussfaktor, indem er Temperatur-Zeit-Diagramme für Leichenveränderungen an verschiedenen Organen beim Aufenthalt im Wasser erstellt.

#### **4.4 Differenzierung der postmortalen Leichenliegezeit mit seinem Einfluss auf die Anfärbarkeit**

Die Zeit vom Eintritt des Todes bis zur Asservierung (und damit verbunden dem Stoppen des postmortalen Zerfallsprozesses) nimmt den größten Einfluss auf die immunhistochemische Anfärbarkeit des GFAP ein (Tab. 4). Die Temperatur ist ein weiterer starker Einflussfaktor und wurde als solcher im oberen Abschnitt diskutiert. In einem weiteren Teil dieser Studie wurde herausgearbeitet, inwieweit eine weitere Differenzierung der postmortalen Liegezeit von Leichen zu einer weiteren Präzisierung bei der Todeszeitbestimmung hilfreich ist. Zugrunde liegt die Überlegung, dass Leichen - auf jeden Fall wenn sie kriminalpolizeilich sichergestellt werden - nach ihrem Auffinden bis zur Obduktion gekühlt gelagert werden. Einheitliche Bestimmungen zur Kühlung gibt es nicht. Die Ermittlung des p-Wertes der Kühlzeit sowie der Liegezeit vor Ort zeigt jedoch, dass die Anfärbarkeit sowohl während der Kühlphase als auch vom Todeszeitpunkt bis zum Leichenfund signifikant abnimmt (Tab. 6). Die Chance auf ein positives Färbeergebnis wird mit jedem Kühltag um den Faktor 1,4 kleiner. Bei der Liegezeit vor Ort beträgt der Faktor 1,63. Beide Werte gruppieren sich um den Faktor 1,52 für die Gesamtliegezeit, die so einen guten Mittelwert zur Todeszeiteinschätzung bietet. Es ist festzustellen, dass die Gesamtliegezeit eine gute Grundlage bietet um Angaben zur Todeszeiteingrenzung zu machen.

Abb. 14 und 15 zeigen bei eingetretenem positivem Färbeergebnis und bekannter Kühlzeit die wahrscheinliche Liegezeit vor Ort (in Tagen). Klar geht für ein positives Färbeergebnis daraus hervor, dass bei längerer Kühlzeit (über mehrere Tage hinweg) nur eine entsprechend kürzere Liegezeit vor Ort wahrscheinlich ist. Vergleicht man die Wahrscheinlichkeitsverteilung der

positiven Fälle (bei gegebener Kühlzeit) über die Liegezeit vor Ort der Leichen mit Todeszeitpunkt im Winterhalbjahr mit denen im Sommerhalbjahr, so liegt die Wahrscheinlichkeit an den ersten Liegetagen vor Ort im Sommer um 5% höher. Im Winter ist ein wahrscheinliches Auftreten von positiven Fällen bis zu 2 Liegetagen vor Ort länger durchaus möglich.

Die postmortale Liegezeit lässt sich auch mit den Parametern, welche nicht zwischen Kühlzeit und Liegezeit vor Ort (LvO) unterscheiden, ermitteln. Die Differenzierung in Liegezeit vor Ort und Kühlzeit kann zu einer verfeinerten Aussage beitragen. Der tägliche Anfärbbarkeitsverlust ist bei Kühlung 1/3 geringer als bei der Liegezeit vor Ort. Da für die Temperatur bei der Leichenaufbewahrung keine eindeutigen gesetzlichen Vorschriften gelten, sollte die gesamte Leichenliegezeit (LL) ohne Unterscheidung der Kühlzeit zur soliden Wahrscheinlichkeitsangabe empfohlen werden.

#### **4.5 Mäusekadaver / Vergleichsreihe mit erfassbaren Umgebungsbedingungen**

Die GFAP-Anfärbbarkeit bei der Mäusekadaver-Versuchsreihe mit erfassbaren Umgebungsbedingungen (Abb. 18) zeigt ebenfalls die Abnahme der Anfärbbarkeit über die Zeit nach Abtötung, wobei die ersten negativen Färbungen früher auftreten und positive Ergebnisse nicht so lange ausgewertet werden können. Das Zeitfenster, mit sowohl positiven als auch negativen Färbeergebnissen, zeigt sich bei den Tierkadavern mit anderen Grenzen als bei der humanen Färbereihe. Ein direkter Vergleich mit den Humanpräparaten kann hier nicht vorgenommen werden. Der unterschiedliche Verlauf der humanen und tierischen Balkendiagramme könnte durch die unterschiedlich großen Verwesungsmassen bei Mensch und Maus oder auch durch größeren Schutz des menschlichen Gehirns durch eine dickere Schädelkalotte verursacht werden. Die Temperatur als Einflussfaktor auf die postmortale Abkühlung und Verwesung erscheint hier auf jeden Fall in erster Linie von Bedeutung zu sein.

Dass die Kopfbehaarung beim Menschen Einfluss auf die postmortale Abkühlung des Gehirns nimmt, konnte bereits nachgewiesen werden (Brinkmann et al. 1976). Mann führte in den 80-er Jahren Studien zur postmortalen Verwesung durch, mit dem Ziel Einflussfaktoren zu untersuchen (Mann et al. 1990). In diesem Rahmen wurden auch Hundekadaver ausgelegt mit dem Ergebnis, dass eine wesentlich schnellere Verwesung vorlag, so dass sich ein Vergleich mit Leichen nicht anbietet, und sie als Studienmodelle in dieser Hinsicht nicht dienen können. Ergebnisse mit vergleichbarer Aussage wurden in dieser Studie mit den Versuchsreihen an Mäusekadavern erzielt. Die Verwesung war gegenüber den Leichen beschleunigt, eine Skelettierung trat bei sommerlichen Temperaturen bereits nach zwei Tagen ein. Die Eignung von Mäusekadavern als Studienmodelle für humane postmortale Zerfallsprozesse sollte nach den erzielten Ergebnissen als äußerst gering eingestuft werden. Eine weitere Ausdehnung der Mäusekadaverstudien zur Erfassung von Einflussfaktoren wurde wegen der eingeschränkten Übertragbarkeit nicht vorgenommen.

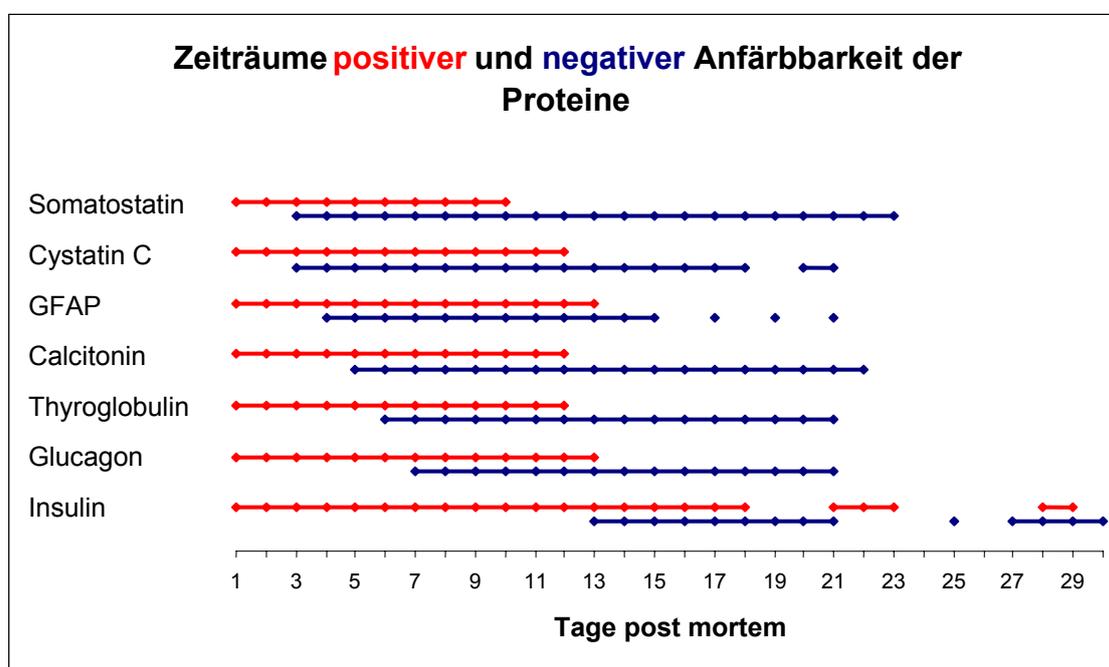
#### **4.6 Immunhistochemische Methoden zur Todeszeitbestimmung**

Diese Arbeit ist als Baustein in einer groß angelegten Untersuchung zu sehen, mit dem Ziel weitere immunhistochemische Tests zur besseren Todeszeiteingrenzung zu entwickeln. Der Test deckt mit dem Fenster (Zeitraum mit sowohl negativen als auch positiven Fällen) vom 4. bis einschließlich 13. Tag p. m. das mittlere postmortale Intervall ab. Er gliedert sich in die Gruppierung der bereits durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen von Insulin mit einem Zeitfenster vom 13. bis einschließlich 29. Tag p. m. (Wehner et al. 1999), Thyroglobulin mit einem Zeitfenster vom 6. bis einschließlich 12. Tag p. m. (Wehner et al. 2000), Glucagon mit einem Zeitfenster vom 7. bis einschließlich 13. Tag p. m. (Wehner et al. 2001b), Calcitonin mit einem Zeitfenster vom 5. bis einschließlich 12. Tag p. m. (Wehner et al. 2001a), Cystatin C mit einem Zeitfenster vom 3. bis einschließlich 12. Tag

p. m. (Wehner et al. 2002) und Somatostatin mit einem Zeitfenster vom 3. bis einschließlich 10. Tag p. m. (Wehner et al. 2003) ein (Abb. 20).

Tritt bei der immunhistochemischen Untersuchung von **GFAP** ein **positives** Ergebnis auf, kann angegeben werden, dass eine postmortale Liegezeit von 13 Tagen oder kürzer vorliegt. Im Anschluss bietet sich die weitere Untersuchung

**Abbildung 20:** Zeiträume positiver und negativer Anfärbarkeit der bisher untersuchten Proteine.



der Proteine Cystatin C, Calcitonin und Thyroglobulin an. Bei eingetretenem positivem Ergebnis kann die postmortale Zeit auf 12 Tage oder kürzer eingegrenzt werden. Die Anschlussuntersuchung des Proteins Somatostatin ist dann sinnvoll. Bei positiver Färbung liegt die untersuchte Leiche 10 Tage oder kürzer nach Eintritt des Todes. Bei negativem Färbeergebnis von Somatostatin oder Cystatin C kann dann der Todeszeitpunkt zwischen 3 und einschließlich 13 Tage zurückliegen. Fällt das Färbeergebnis von Calcitonin negativ aus, kann der Todeszeitpunkt zwischen 5 und einschließlich 13 Tage zurückliegen. Bei

negativem Färbeergebnis von Thyroglobulin liegt der Todeszeitpunkt zwischen 6 bis einschließlich 13 Tage zurück. Fällt die Färbung von Insulin ebenfalls positiv aus, kann die untersuchte Leiche bis zu 29 Tagen gelegen haben. Die präziseste Angabe mit 13 Tagen postmortaler Liegezeit ergibt sich bei der Färbekombination Insulin negativ, GFAP und Glucagon positiv.

Liegt eine **negative GFAP-Färbung** vor, muss die Leiche bereits 4 Tage oder länger tot sein. Fällt die Färbung von Somatostatin oder Cystatin C ebenfalls negativ aus, kommt auch eine kürzere Liegezeit von 3 Tagen noch in Frage. Bei positiver immunhistochemischer Färbung von Somatostatin kann der Liegezeitraum von 4 bis einschließlich 10 Tagen eingegrenzt werden – bei Cystatin C von 4 bis einschließlich 12 Tagen. Bei positivem Ergebnis von Calcitonin oder Thyroglobulin entsteht ein Liegezeitraum zwischen 4 bis einschließlich 12 Tagen. Bei positivem Färbeergebnis von Glucagon entsteht ein Liegezeitraum zwischen 4 bis einschließlich 13 Tagen, bei positiver immunhistochemischer Untersuchung von Insulin reicht der Zeitraum sogar bis zu 29 Tagen.

Im Anhang 3 ist eine Tabelle mit allen theoretisch möglichen Ergebniskombinationen bei Anwendung aller bisher untersuchten immunhistochemischen Methoden aufgeführt. Abgelesen werden, kann in Abhängigkeit der Testergebnisse, die entsprechend in Frage kommende eingegrenzte Liegezeit der untersuchten Leiche.

Bei entsprechenden Ergebniskombinationen der Proteine GFAP, Somatostatin, Cystatin C, Calcitonin, Thyroglobulin, Glucagon und Insulin können Zeiträume vom 3. bis einschließlich 6. Tag p. m. und 11. bis einschließlich 15., sowie 29. / 30. Tag p. m. tageweise unterschieden werden, während im Zeitraum zwischen 7. und 10. sowie 15. und 29. postmortalen Tag keine weitere Differenzierung möglich ist.

## 5 Zusammenfassung

Die Eingrenzung der Todeszeit mit der Todeszeitbestimmung wird für Gerichtsmediziner immer schwieriger, je weiter der Todeszeitpunkt zurückliegt. Mit der immunhistochemischen Untersuchung des GFAP soll eine weitere immunhistochemische Methode zur Todeszeitbestimmung für das mittlere bis späte postmortale Intervall entwickelt werden. Die zeitabhängige postmortale Veränderung der tertiären Proteinstruktur mit seinen antigenen Strukturen wird hier zur Eingrenzung des Todeszeitpunktes genutzt. Eine immunhistochemische Anfärbarkeit war bis zum 14. Tag p. m. immer gegeben. Erste negative Ergebnisse wurden ab dem 4. Tag p. m. erzielt. Bei einem positiven Färbeergebnis muss also der Todeszeitpunkt der Leiche in einem Zeitraum unter 14 Tagen liegen. Bei einem negativen Färbeergebnis liegt eine Leichenliegezeit von länger als 3 Tagen nach Todeseintritt vor. Da die meisten Leichen kurz nach ihrem Ableben aufgefunden werden, liegt die Wahrscheinlichkeit für eine kurze Liegezeit bei einer Fundleiche höher. Unter zusätzlicher Berücksichtigung dieser Liegewahrscheinlichkeitsverteilung können von Gerichtsmedizinern auf der Basis eines positiven Ergebnisses folgende Aussagen getroffen werden: Die Wahrscheinlichkeit für die Liegezeit von 1 Tag liegt bei 50%, für 2 Tage bei 25% und für 3 Tage bei 10%. Mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit kann man davon ausgehen, dass eine aufgefundene Leiche 4 Tage oder kürzer liegt, mit 50%-iger Wahrscheinlichkeit, dass sie höchstens einen Tag gelegen hat.

Untersucht wurde in dieser Studie ebenfalls, welche Faktoren auf die immunhistochemische Färbeergebnisse Einfluss nehmen und wie diese Einflussfaktoren bei der Todeszeitbestimmung berücksichtigt werden können. Die Dauer der Liegezeit nach Todeseintritt nimmt den größten Einfluss auf die

Anfärbarkeit des GFAP. Verfeinert werden kann die Aussage zwischen dem 3. und 14. Tag p. m. bei Berücksichtigung des Todeszeitpunktes (Sommer- / Winterhalbjahr). Die Chance auf Anfärbarkeit ist im Sommerhalbjahr niedriger (OR = 0,34). Die herausgearbeiteten Unterschiede könnten in erster Linie durch Temperaturunterschiede verursacht sein. Die Temperatur ist vermutlich auch für die Unterschiede an verschiedenen Fundorten verantwortlich. Werden Leichen im Freien aufgefunden, nimmt die Temperatur einen stärkeren Einfluss auf die immunhistochemische Anfärbarkeit. Abweichungen vom Durchschnitt müssen hier, im Gegensatz zu Leichen mit Fund im Innenraum, in stärkerem Maße in Betracht gezogen werden.

Eine besondere Berücksichtigung der Kühlzeit bringt nur begrenzte Verbesserungen.

Diese Arbeit liefert einen weiteren Baustein zu einer groß angelegten Untersuchung mit dem Ziel, immunhistochemische Tests zur besseren Todeszeiteingrenzung zu entwickeln. Der Test deckt mit dem Fenster zwischen 4. und 14. Tag p. m. das mittlere postmortale Intervall ab.

## 6 Literaturverzeichnis

Al Alousi, L. M., Anderson, R. A., Worster, D. M. und Land, D. V. (2001) Multiple-probe thermography for estimating the postmortem interval: II. Practical versions of the Triple-Exponential Formulae (TEF) for estimating the time of death in the field. *J. Forensic Sci.* 46: 323-327.

Aldskogius, H. und Kozlova, E. N. (1998) Central neuron-glia and glial-glia interactions following axon injury. *Prog. Neurobiol.* 55: 1-26.

Althoff, H. (1974) [For which problems can one expect reliable pathomorphological findings after exhumation? (author's transl)]. *Z. Rechtsmed.* 75: 1-20.

Babapulle, C. J. und Jayasundera, N. P. (1993) Cellular changes and time since death. *Med. Sci. Law* 33: 213-222.

Becker, L., Mito, T., Takashima, S. und Onodera, K. (1991) Growth and development of the brain in Down syndrome. *Prog. Clin. Biol. Res.* 373: 133-152.

Bonani, G., Ivy, S., Hyjdas, I., Nikolaus, Th. R. und Suter, M. (1994) AMS 14C age determination of tissue, bone and grass samples from the Ötztal Iceman. *Radiocarbon* 36(2): 247-250.

Borit, A., Brooks, T. E., Ordonez, N. G. und Kakulas, B. A. (1986) Central neural antigens: detection and diagnostic application. *Crit Rev. Clin. Lab Sci.* 23: 219-243.

Brenner, M. (1994) Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. *Brain Pathol.* 4: 245-257.

Brinkmann, B., May, D. und Riemann, U. (1976) Postmortem temperature equilibration of the structures of the head. *Z. Rechtsmed.* 78: 69-82.

Cingolani, M., Osculati, A., Tombolini, A., Tagliabracci, A., Ghimenton, C. und Ferrara, S. D. (1994) Morphology of sweat glands in determining time of death. *Int. J. Legal Med.* 107: 132-140.

Dahl, D. und Bignami, A. (1973) Glial fibrillary acidic protein from normal human brain. Purification and properties. *Brain Res.* 57: 343-360.

Dahl, D. und Bignami, A. (1974) Heterogeneity of the glial fibrillary acidic protein in gliosed human brains. *J. Neurol. Sci.* 23: 551-563.

Dahl, D. und Bignami, A. (1976) Immunogenic properties of the glial fibrillary acidic protein. *Brain Res.* 116: 150-157.

De Groot, C. J., Theeuwes, J. W., Dijkstra, C. D. und van, d., V. (1995) Postmortem delay effects on neuroglial cells and brain macrophages from Lewis rats with acute experimental allergic encephalomyelitis: an immunohistochemical and cytochemical study. *J. Neuroimmunol.* 59: 123-134.

Dokgoz, H., Arican, N., Elmas, I. und Fincanci, S. K. (2001) Comparison of morphological changes in white blood cells after death and in vitro storage of blood for the estimation of postmortem interval. *Forensic Sci. Int.* 124: 25-31.

Eng, L. F. (1985) Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 8: 203-214.

Eng, L. F. und Ghirnikar, R. S. (1994) GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.* 4: 229-237.

Eng, L. F., Ghirnikar, R. S. und Lee, Y. L. (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res.* 25: 1439-1451.

Eng, L. F., Smith, M. E., de Vellis, J. und Skoff, R. P. (1985) Recent studies of the glial fibrillary acidic protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 455: 525-537.

Eng, L. F., Yu, A. C. und Lee, Y. L. (1992) Astrocytic response to injury. *Prog. Brain Res.* 94: 353-365.

Forster, B., Ropohl, D. und Raule, P. (1977) [A new formula for the measurement of rigor mortis: the determination of the FRR-index (author's transl)]. *Z. Rechtsmed.* 80: 51-54.

Galou, M., Gao, J., Humbert, J., Mericskay, M., Li, Z., Paulin, D. und Vicart, P. (1997) The importance of intermediate filaments in the adaptation of tissues to mechanical stress: evidence from gene knockout studies. *Biol. Cell* 89: 85-97.

Goldman, J. E., Schaumburg, H. H. und Norton, W. T. (1978) Isolation and characterization of glial filaments from human brain. *J. Cell Biol.* 78: 426-440.

Gos, T. und Raszeja, S. (1993) Postmortem activity of lactate and malate dehydrogenase in human liver in relation to time after death. *Int. J. Legal Med.* 106: 25-29.

Grassberger, M. und Reiter, C. (2001) Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram. *Forensic Sci. Int.* 120: 32-36.

- Henssge, C. (1988) Death time estimation in case work. I. The rectal temperature time of death nomogram. *Forensic Sci. Int.* 38: 209-236.
- Henssge, C. (2002) Todeszeitbestimmung an Leichen. *Rechtsmedizin* 12: 112-131.
- Henssge, C., Althaus, L., Bolt, J., Freislederer, A., Haffner, H. T., Henssge, C. A., Hoppe, B. und Schneider, V. (2000) Experiences with a compound method for estimating the time since death. II. Integration of non-temperature-based methods. *Int. J. Legal Med.* 113: 320-331.
- Hunnius, P., Mallach, H. J. und Mittmeyer, H. J. (1973) [Quantitative pressure measurements of livores mortis relative to the determination of the time of death (author's transl)]. *Z. Rechtsmed.* 73: 235-244.
- Inagaki, M., Nakamura, Y., Takeda, M., Nishimura, T. und Inagaki, N. (1994) Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol.* 4: 239-243.
- Ith, M., Bigler, P., Scheurer, E., Kreis, R., Hofmann, L., Dirnhöfer, R. und Boesch, C. (2002) Observation and identification of metabolites emerging during postmortem decomposition of brain tissue by means of in situ <sup>1</sup>H-magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson. Med.* 48: 915-920.
- Jachau, K. und Krause, D. (2002) Späte Leichenerscheinungen. *Rechtsmedizin* 12: 175-186.
- Jacob, J., Robertson, N. J. und Hilton, D. A. (2003) The clinicopathological spectrum of Rosenthal fibre encephalopathy and Alexander's disease: a case report and review of the literature. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74: 807-810.
- Jacque, C. M. (1991) [The glial fibrillary acidic protein]. *Presse Med.* 20: 1384-1390.
- Jessen, K. R., Thorpe, R. und Mirsky, R. (1984) Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: an immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes. *J. Neurocytol.* 13: 187-200.
- Joachim, H. und Feldmann, U. (1980) [Quantimetric investigations of the time of death by estimating the postmortem threshold (rheobase) of human skeletal muscles to electric stimulus by direct current (author's transl)]. *Z. Rechtsmed.* 85: 5-22.
- Kaatsch, H. J., Schmidtke, E. und Nietsch, W. (1994) Photometric measurement of pressure-induced blanching of livor mortis as an aid to estimating time of death. Application of a new system for quantifying pressure-induced blanching in lividity. *Int. J. Legal Med.* 106: 209-214.

Kahana, T., Almog, J., Levy, J., Shmeltzer, E., Spier, Y. und Hiss, J. (1999) Marine taphonomy: adipocere formation in a series of bodies recovered from a single shipwreck. *J. Forensic Sci.* 44: 897-901.

Klein, A. und Klein, S. (1982) [Postmortem pupil reaction to pharmacological and electrical stimulation]. *Beitr. Gerichtl. Med.* 40: 451-461.

Knight, B. (1988) The evolution of methods for estimating the time of death from body temperature. *Forensic Sci. Int.* 36: 47-55.

Lalley, PA., Davisson, MT., Graves, J. und et al. (1994) Report of the committee on comparative mapping. *Cytogenet Cell Genet* 51: 259-275.

Lotterle, J., Schmierl, G. und Schellmann, B. (1982) [Effect of soil conditions on corpse decomposition over a long period of time]. *Beitr. Gerichtl. Med.* 40: 197-201.

Madea, B. (1992) Estimating time of death from measurement of the electrical excitability of skeletal muscle. *J. Forensic Sci. Soc.* 32: 117-129.

Madea, B. und Henssge, C. (1988) Determination of the time since death. II. Electrical excitability of skeletal muscles. Current state and recent developments. *Acta Med. Leg. Soc. (Liege)* 38: 91-108.

Madea, B. und Henssge, C. (1990a) [Postmortem behavior of the rheobase]. *Z. Rechtsmed.* 103: 435-452.

Madea, B. und Henssge, C. (1990b) [Practical value of post-mortem electrical excitability in determining time of death]. *Beitr. Gerichtl. Med.* 48: 413-422.

Madea, B., Henssge, C., Honig, W. und Gerbracht, A. (1989) References for determining the time of death by potassium in vitreous humor. *Forensic Sci. Int.* 40: 231-243.

Madea, B., Hermann, N. und Henssge, C. (1990) [Calcium concentration in vitreous humor--a means for determining time of death?]. *Beitr. Gerichtl. Med.* 48: 489-499.

Mann, R. W., Bass, W. M. und Meadows, L. (1990) Time since death and decomposition of the human body: variables and observations in case and experimental field studies. *J. Forensic Sci.* 35: 103-111.

Marchenko, M. I. (2001) Medicolegal relevance of cadaver entomofauna for the determination of the time of death. *Forensic Sci. Int.* 120: 89-109.

McDowall, K. L., Lenihan, D. V., Busuttill, A. und Glasby, M. A. (1998) The use of absolute refractory period in the estimation of early postmortem interval. *Forensic Sci. Int.* 91: 163-170.

- McLendon, R. E. und Bigner, D. D. (1994) Immunohistochemistry of the glial fibrillary acidic protein: basic and applied considerations. *Brain Pathol.* 4: 221-228.
- Messing, A. und Brenner, M. (2003) GFAP: functional implications gleaned from studies of genetically engineered mice. *Glia* 43: 87-90.
- Micozzi, M. S., D., M. und D., Ph. (1986) Experimental study of postmortem change under field conditions: effects of freezing, thawing, and mechanical injury. *J. Forensic Sci.* 31: 953-961.
- Mittmeyer, H. J. (1979) [Investigations to determine the time of death, late post mortem, by means of electrophoresis of inner organs (author's transl)]. *Z. Rechtsmed.* 84: 47-56.
- Mittmeyer, H. J. (1980a) [Determination of the myo-albumin content. A possibility to determine the hour of death (author's transl)]. *Z. Rechtsmed.* 84: 233-237.
- Mittmeyer, H. J. (1980b) [Muscle electrophoretic study in the determination of the time of death]. *Beitr. Gerichtl. Med.* 38: 177-185.
- Mittmeyer, H. J. und Strebel, K. H. (1980) [Experimental examinations on forensic determination of time of death by electrofocusing of soluble muscle protein (author's transl)]. *Z. Rechtsmed.* 85: 235-240.
- Namekawa, M., Takiyama, Y., Aoki, Y., Takayashiki, N., Sakoe, K., Shimazaki, H., Taguchi, T., Tanaka, Y., Nishizawa, M., Saito, K., Matsubara, Y. und Nakano, I. (2002) Identification of GFAP gene mutation in hereditary adult-onset Alexander's disease. *Ann. Neurol.* 52: 779-785.
- Neis, P., Hille, R., Paschke, M., Pilwat, G., Schnabel, A., Niess, C. und Bratzke, H. (1999) Strontium90 for determination of time since death. *Forensic Sci. Int.* 99: 47-51.
- Niess, C., Amendt, J., Krettek, R. und Zehner, R. (2001) Zur Bestimmung der Leichenliegezeit mit Hilfe nekrophiler Insekten in der kalten Jahreszeit. *Rechtsmedizin* 11: 64-68.
- Norenberg, M. D. (1994) Astrocyte responses to CNS injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53: 213-220.
- O'Callaghan, J. P., Jensen, K. F. und Miller, D. B. (1995) Quantitative aspects of drug and toxicant-induced astrogliosis. *Neurochem. Int.* 26: 115-124.
- Pekny, M. (2001) Astrocytic intermediate filaments: lessons from GFAP and vimentin knock-out mice. *Prog. Brain Res.* 132: 23-30.

Perry, W. L., III, Bass, W. M., Riggsby, W. S. und Sirotkin, K. (1988) The autodegradation of deoxyribonucleic acid (DNA) in human rib bone and its relationship to the time interval since death. *J. Forensic Sci.* 33: 144-153.

Pfeiffer, S., Milne, S. und Stevenson, R. M. (1998) The natural decomposition of adipocere. *J. Forensic Sci.* 43: 368-370.

Piotrowska, N. und Goslar, T. (2002) Preparation of bone samples in the Gliwice Radiocarbon Laboratory for AMS radiocarbon dating. *Isotopes. Environ. Health Stud.* 38: 267-275.

Prinoth-Fornwagner, R. und Nikolaus, Th. R. (1994) The man in the ice: results from radiocarbon dating. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 92: 282-290.

Prochiantz, A. und Mallat, M. (1988) Astrocyte diversity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 540: 52-63.

Reh, H., Haarhoff, K. und Vogt, C. D. (1977) [The estimation of the time of death of corpses recovered from water (author's transl)]. *Z. Rechtsmed.* 79: 261-266.

Reinhardt, W., Raser, G., Dietz, W., Klein, A. und Lenz, E. (2000) Analyse von Dentalamalgamen - eine Methode zur Eingrenzung der Leichenliegezeit. *Rechtsmedizin* 10: 61-64.

Reiter, C. (1984) [Growth behavior of the blue blowfly *Calliphora vicina* maggots]. *Z. Rechtsmed.* 91: 295-308.

Reiter, C. und Hajek, P. (1984) [Age-dependent changes in the intestinal contents of blowfly maggots--a study method in the framework of forensic determination of the time of death]. *Z. Rechtsmed.* 92: 39-45.

Rothschild, M. A., Schmidt, V. und Pedal, I. (1996a) [Cadaver lipid: various origins add to the difficulty of assessing postmortem time]. *Arch. Kriminol.* 197: 165-174.

Rothschild, M. A., Schmidt, V. und Schneider, V. (1996b) Adipocere--problems in estimating the length of time since death. *Med. Law* 15: 329-335.

Rutka, J. T., Murakami, M., Dirks, P. B., Hubbard, S. L., Becker, L. E., Fukuyama, K., Jung, S., Tsugu, A. und Matsuzawa, K. (1997) Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *J. Neurosurg.* 87: 420-430.

Schoenly, K. (1992) A statistical analysis of successional patterns in carrion-arthropod assemblages: implications for forensic entomology and determination of the postmortem interval. *J. Forensic Sci.* 37: 1489-1513.

Schröder, H., Klotzbach, H., Oesterhelweg, L., Gehl, A. und Püschel, K. (2001) Artenspektrum und zeitliches Auftreten von Insekten an Wohnungsleichen im Großraum Hamburg. *Rechtsmedizin* 11.

Shehab, S. A., Cronly-Dillon, J. R., Nona, S. N. und Stafford, C. A. (1990) Preferential histochemical staining of protoplasmic and fibrous astrocytes in rat CNS with GFAP antibodies using different fixatives. *Brain Res.* 518: 347-352.

Sticht, G., Ramme, H. und Dotzauer, G. (1981) [Morphologic and toxicologic findings after a 17 year burial of a corpse]. *Beitr. Gerichtl. Med.* 39: 177-183.

Suri, M. (2001) What's new in...neurogenetics? Focus on neurodegenerative disorders. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 5: 221-224.

Swift, B., Lauder, I., Black, S. und Norris, J. (2001) An estimation of the post-mortem interval in human skeletal remains: a radionuclide and trace element approach. *Forensic Sci. Int.* 117: 73-87.

Szibor, R., Schubert, C. und Schöning, R. (1998) Pollen analysis reveals murder season. *Nature* 395: 449-450.

Taylor, R. E., Suchey, J. M., Payen, L. A. und Slota, P. J., Jr. (1989) The use of radiocarbon ( $^{14}\text{C}$ ) to identify human skeletal materials of forensic science interest. *J. Forensic Sci.* 34: 1196-1205.

Uyeda, C. T., Eng, L. F. und Bignami, A. (1972) Immunological study of the glial fibrillary acidic protein. *Brain Res.* 37: 81-89.

Vain, A., Kauppila, R., Humal, L. H. und Vuori, E. (1992) Grading rigor mortis with myotonometry--a new possibility to estimate time of death. *Forensic Sci. Int.* 56: 147-150.

Van de Voorde, V. und Van Dijck, P. J. (1982) Determination of the time of death by fungal growth. *Z. Rechtsmed.* 89: 75-80.

Vass, A. A., Bass, W. M., Wolt, J. D., Foss, J. E. und Ammons, J. T. (1992) Time since death determinations of human cadavers using soil solution. *J. Forensic Sci.* 37: 1236-1253.

Weber, K. und Geisler, N. (1985) Intermediate filaments: structural conservation and divergence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 455: 126-143.

Wehner, F., Wehner, H. D., und Claßen, I. Eingrenzung der Leichenliegezeit mittels immunhistochemischen Nachweises von Cystatin-C. 81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Rostock . 2002.  
Ref Type: Conference Proceeding

Wehner, F., Wehner, H. D. und Hahnenberger, K. (2003) Delimitation of the time of death by immunohistochemical detection of Somatostatin. Third European Academy of Forensic Science Triennial Meeting, Istanbul, Turkey.

Wehner, F., Wehner, H. D., Schieffer, M. C. und Subke, J. (1999) Delimitation of the time of death by immunohistochemical detection of insulin in pancreatic beta-cells. *Forensic Sci. Int.* 105: 161-169.

Wehner, F., Wehner, H. D., Schieffer, M. C. und Subke, J. (2000) Delimitation of the time of death by immunohistochemical detection of thyroglobulin. *Forensic Sci. Int.* 110: 199-206.

Wehner, F., Wehner, H. D. und Subke, J. (2001a) Delimitation of the time of death by immunohistochemical detection of calcitonin. *Forensic Sci. Int.*

Wehner, F., Wehner, H. D. und Subke, J. (2001b) Delimitation of the time of death by immunohistochemical detection of glucagon in pancreatic alpha-cells. *Forensic Sci. Int.* 124: 192-199.

Weinmann, W. (1928) Histologische Hirnbefunde bei Exhumierungen. *Dtsch. Z. Ges. Gerichtl. Med.* 11: 388-395.

Willey, P. und Snyder, L. M. (1989) Canid modification of human remains: implications for time-since-death estimations. *J. Forensic Sci.* 34: 894-901.

Wittig, H., Pohle, W., Düring, U., Jachau, K., Laufer, M. und Krause, D. (2001) Analyse des Pilzsporen-Spektrums im Nasen-Rachen-Raum zur Eingrenzung von Sterbeort und -zeit. *Rechtsmedizin* 11: 26-29.

Wu, V. W. und Schwartz, J. P. (1998) Cell culture models for reactive gliosis: new perspectives. *J. Neurosci. Res.* 51: 675-681.

## 7 Anhang

### Anhang 1: Färbeprotokoll

#### **Färbeprotokoll:**

- Entparaffinierung der Schnitte mit Xylol (Xylolersatzlösung Rothiclear<sup>R</sup>) für 30 min.
- Absteigende Alkoholreihe (99,9%ige, 96%ige, 80%ige, 70%ige Ethanollösung) für je 7 min pro Kammer.
- Demineralisiertes Wasser für 5 min.
- Umrahmen der Schnitte mit Dako-Pen<sup>R</sup> for Immunhistochemistry (Fa DAKO A/S, Code No. S 2002).
- Mikrowellendemaskierung für 2 x 5 min bei 800 Watt in 200ml Mikrowellenpuffer (Fa DAKO A/S: Buffer for Antigen Retrieval, Code No. S 2031, Citratpufferkonzentrat 1:9 verdünnt, PH 6,0).
- Abkühlen der Schnitte für 20 min.
- Spülen in TBS-Puffer für 5 min (Tris-Puffer: 6,1g Tris, 37 ml 1n-HCl in 1l Aqua dest.; PH 7,6 (0,05 molar); TBS-Puffer: 1l 0,05 molarer Tris-Puffer plus 9l 0,85%ige NaCl-Lösung).
- Biotin Blockierung (Fa DAKO A/S: Ready-To-Use Biotin Blocking System, Code No. X 0590) für je 10 min.
- Spülen in TBS-Puffer 2 x 3 min.
- Peroxidase Blockierung (3%ige wässrige Wasserstoffperoxid-Lösung) für 10 min.
- Spülen in TBST-Puffer (Fa DAKO A/S: TBST Tris Buffered Saline with Tween 20, Code No. S 3306, Konzentrat 1:9 verdünnt (PH 7,6)) für 2 x 3 min.

- Protein Blockierung mit Kaninchenserum (Fa DAKO A/S: Rabbit Serum (Normal), Code No. X 0902, Verdünnung 1:20 mit 3% BSA-Lösung (BSA-Lösung in TBS-Puffer; Fa Roth: Albumin bovine fraction V, Art.: 8076,2)) für 30 min.
- Primärantikörper (Fa DAKO A/S: Monoclonal Mouse Anti-Human Glial Fibrillary Acidic Protein, Code No. M 0761, Verdünnung 1:200 mit 1% BSA-Lösung) Einwirkung für 30 min bei 37°C.
- Spülen in TBST-Puffer für 2 x 3 min.
- Sekundärantikörper (Fa DAKO A/S: Biotinylated F(ab')<sub>2</sub> Fragment of Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins, Code No. E 0413, Verdünnung 1:200 mit 1% BSA-Lösung) Einwirkung für 30 min.
- Spülen in TBST-Puffer für 2 x 3 min.
- Avidin-Biotin Komplex (Fa DAKO A/S: AB Complex / HRP, Code No. K 0355) Einwirkung für 30 min.
- Spülen in TBST-Puffer für 2 x 3 min.
- DAB-Lösung / Chromogen (Fa Dako A/S: Liquid DAB Substrate-Chromogen System, Code No. K 3466) für 2 min.
- Spülen in Wasser für 5 min.
- Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer für 2 min (Rezeptur: 1g Hämatoxylin in 1 L Aqua dest. + 0,2g NaJO<sub>3</sub> + 50g Kaliumaluminiumsulfat, nach Durchschütteln: Zugabe von 50g Chloralhydrat + 1g Citronensäure).
- Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 min.
- Eindeckeln mit erwärmter Glyceringelatine von Kaisers.

**Anhang 2:** Übersicht über gefärbten Datensatz. AN: Asservat-Nr. (Fall/Jahr); LL: Leichenliegezeit (in Tagen); LvO: Liegezeit vor Ort (Todeszeitpunkt bis zum Auffinden der Leiche, in Tagen); GFAP (immunhistochem. Färbeergebnis); Umgeb: Leichenfundort (I: Innenraum, A: im Freien); Halbj: Todeszeitpunkt (W: Winterhalbjahr, S: Sommerhalbjahr); KZ: Kühlzeit (Tage vom Auffinden der Leiche bis zur Obduktion).

AN	LL	LvO	GFAP	Umgeb	Halbj	KZ
13/95	6	4	+	I	W	2
79/95	15	14	-	I	W	1
99/95	7	2	-	I	W	5
116/95	5	4	+	I	W	1
131/95	7	0	+	I	W	7
143/95	9	0	-	I	W	9
153/95	5	0	+	I	W	5
155/95	6	0	+	I	W	6
156/95	7	0	-	I	W	7
166/95	8	7	+	I	W	1
170/95	6	0	+	I	W	6
178/95	6	0	+	I	W	6
181/95	8	0	+	I	W	8
183/95	5	3	+	I	W	2
203/95	5	0	+	I	S	5
215/95	7	0	-	I	S	7
230/95	5	0	+	A	S	5
254/95	1	0	+	A	S	1
275/95	6	5	-	I	S	1
279/95	7	0	+	I	S	7
303/95	8	3	+	I	S	5
327/95	6	0	+	I	S	6
357/95	5	5	+	I	S	0
392/95	9	6	+	I	S	3
415/95	11	2	-	I	S	9
422/95	8	0	+	I	S	8
454/95	6	0	+	I	W	6
464/95	10	0	+	A	W	10
548/95	6	4	-	A	W	2
7/96	5	0	+	I	W	5
13/96	7	6	+	I	W	1
54/96	6	3	+	I	W	3
61/96	5	2	+	A	W	3
62/96	8	0	-	I	W	8
69/96	5	3	+	I	W	2
73/96	6	3	-	I	W	3
80/96	6	5	-	I	W	1
156/96	5	3	+	I	W	2
157/96	5	4	+	I	W	1
184/96	9	0	+	I	W	9
191/96	5	0	+	I	W	5
193/96	7	7	+	A	W	0

AN	LL	LvO	GFAP	Umgeb	Halbj	KZ
215/96	6	5	-	I	S	1
221/96	7	6	-	A	S	1
235/96	5	0	+	I	S	5
236/96	7	0	-	I	S	7
240/96	6	5	-	A	S	1
305/96	21	3	-	I	S	18
368/96	8	3	-	I	S	5
404/96	8	0	-	I	S	8
406/96	8	7	+	I	S	1
466/96	6	0	-	I	W	6
488/96	8	4	+	I	W	4
500/96	7	5	-	I	W	2
532/96	8	0	-	I	W	8
3/98	2	1	+	I	W	1
4/98	1	0	+	I	W	1
7/98	12	10	+	I	W	2
9/98	3	0	+	I	W	3
15/98	3	0	+	A	W	3
16/98	4	0	-	I	W	4
17/98	2	1	+	A	W	1
19/98	2	0	+	I	W	2
26/98	9	8	+	I	W	1
27/98	11	10	-	I	W	1
29/98	3	0	+	A	W	3
31/98	2	0	+	A	W	2
33/98	2	1	+	I	W	1
34/98	2	0	+	A	W	2
36/98	3	1	+	I	W	2
38/98	4	2	+	I	W	2
43/98	2	0	+	A	W	2
57/98	6	0	+	A	W	6
66/98	5	0	+	I	W	5
68/98	2	0	+	I	W	2
71/98	3	0	+	I	W	3
79/98	5	0	-	I	W	5
86/98	4	0	-	I	W	4
87/98	4	1	+	A	W	3
98/98	2	0	+	I	W	2
119/98	14	13	-	I	W	1
122/98	7	6	-	I	W	1
147/98	4	0	-	I	S	4
153/98	15	14	-	A	W	1

AN	LL	LvO	GFAP	Umgeb	Halbj	KZ
154/98	17	14	-	I	W	3
155/98	4	0	+	A	S	4
158/98	4	0	-	I	S	4
161/98	1	0	+	A	S	1
162/98	3	0	+	I	S	3
166/98	1	0	+	I	S	1
167/98	1	0	+	I	S	1
168/98	3	0	+	I	S	3
169/98	2	0	+	I	S	2
171/98	1	0	+	I	S	1
174/98	1	0	+	A	S	1
175/98	1	0	+	I	S	1
179/98	1	1	+	I	S	0
186/98	3	0	+	I	S	3
191/98	1	1	+	I	S	0
201/98	13	12	-	I	S	1
206/98	4	0	+	I	S	4
223/98	7	0	+	I	S	7
227/98	4	3	-	A	S	1
237/98	7	0	-	I	S	7
242/98	9	8	-	A	S	1
254/98	11	10	-	I	S	1
267/98	5	1	-	I	S	4
284/98	7	0	-	A	S	7
285/98	4	0	-	I	S	4
287/98	4	0	-	I	S	4
290/98	6	0	+	I	S	6
296/98	6	0	-	I	S	6
311/98	12	11	-	I	S	1
316/98	6	5	-	I	S	1
317/98	9	8	-	I	S	1
328/98	1	0	+	I	S	1
329/98	4	0	+	I	S	4
332/98	1	0	+	I	S	1
336/98	2	0	+	I	S	2
351/98	4	0	+	A	W	4
352/98	4	0	+	A	W	4
361/98	4	0	-	I	W	4
362/98	5	3	-	I	W	2
375/98	10	7	+	I	W	3
393/98	10	8	-	I	W	2
412/98	3	0	+	I	W	3
415/98	4	0	+	I	W	4
417/98	2	0	+	I	W	2
420/98	2	0	+	I	W	2
426/98	3	0	+	I	W	3
432/98	2	0	+	A	W	2
433/98	8	5	-	I	W	3
441/98	1	0	+	I	W	1
448/98	4	0	+	I	W	4
452/98	1	0	+	I	W	1
462/98	6	0	-	I	W	6
470/98	1	0	+	A	W	1
493/98	4	0	-	I	W	4

AN	LL	LvO	GFAP	Umgeb	Halbj	KZ
1/99	1	0	+	I	W	1
2/99	2	0	+	A	W	2
3/99	3	0	+	I	W	3
4/99	1	0	+	A	W	1
5/99	2	0	+	I	W	2
7/99	1	0	+	I	W	1
11/99	1	1	+	I	W	0
14/99	5	4	+	I	W	1
17/99	36	6	-	I	W	30
20/99	2	0	+	I	W	2
21/99	3	0	+	I	W	3
22/99	3	0	+	I	W	3
25/99	2	0	+	A	W	2
26/99	3	0	+	A	W	3
29/98	4	0	+	A	W	4
30/99	3	0	+	I	W	3
31/98	2	0	+	I	W	2
35/98	3	0	+	I	W	3
37/99	2	0	+	A	W	2
38/99	1	0	+	A	W	1
40/99	6	5	+	I	W	1
42/99	4	0	+	I	W	4
43/99	5	3	-	I	W	2
44/99	1	1	+	A	W	0
48/99	5	3	+	A	W	2
51/99	2	0	+	A	W	2
57/99	5	0	+	I	W	5
59/99	5	0	+	I	W	5
60/99	8	6	+	I	W	2
61/99	2	0	+	I	W	2
70/99	1	1	+	I	W	0
76/99	5	0	+	A	W	5
78/99	2	0	+	I	W	2
84/99	3	0	+	A	W	3
85/99	4	0	+	I	W	4
90/99	3	0	+	I	W	3
91/99	3	0	+	A	W	3
95/99	3	2	+	I	W	1
97/99	5	0	+	I	W	5
98/99	10	9	+	I	W	1
100/99	2	0	+	I	W	2
103/99	1	0	+	I	W	1
111/99	10	9	+	I	W	1
112/99	4	0	+	I	W	4
118/99	6	0	+	I	W	6
121/99	34	32	-	I	W	2
127/99	7	6	+	A	W	1
132/99	6	0	+	I	W	6
134/99	1	0	+	I	S	1
139/99	1	0	+	I	S	1
140/99	2	2	+	A	S	0
141/99	2	0	+	I	S	2
148/99	2	0	+	I	S	2
155/99	3	0	+	A	S	3

AN	LL	LvO	GFAP	Umgeb	Halbj	KZ
164/99	1	0	+	A	S	1
169/99	4	0	-	A	S	4
184/99	15	14	-	A	S	1
202/99	7	0	-	I	S	7
223/99	5	3	-	I	S	2
226/99	3	0	+	I	S	3
230/99	1	0	+	I	S	1
231/99	7	4	+	I	S	3
232/99	3	0	+	A	S	3
235/99	7	6	-	I	S	1
236/99	2	0	+	A	S	2
241/99	2	0	+	I	S	2
242/99	3	0	+	I	S	3
243/99	1	0	+	A	S	1
248/99	4	4	+	I	S	0
252/99	2	0	+	I	S	2
255/99	3	0	+	I	S	3
270/99	3	0	+	I	S	3
274/99	4	0	+	I	S	4
277/99	6	5	-	I	S	1
282/99	4	0	+	I	S	4
284/99	1	0	+	A	S	1
287/99	1	0	+	I	S	1
288/99	4	0	+	I	S	4
289/99	3	0	+	A	S	3
290/99	2	0	+	I	S	2
291/99	11	0	+	I	S	11
292/99	2	0	+	A	S	2
293/99	19	16	-	I	S	3
294/99	3	0	+	I	S	3
295/99	6	3	+	I	S	3
297/99	2	0	+	I	S	2
298/99	2	0	+	I	S	2
300/99	1	0	+	I	S	1
303/99	8	4	-	I	S	4
304/99	7	6	-	A	S	1
308/99	1	0	+	I	S	1
310/99	1	0	+	I	S	1
314/00	1	0	+	A	S	1
315/99	4	4	+	A	S	0
317/99	2	0	+	I	S	2
318/99	1	1	+	I	S	0
320/99	2	0	+	I	W	2
321/99	4	0	+	I	W	4
326/99	2	0	+	I	W	2
336/99	4	0	+	I	W	4
337/99	4	0	+	I	W	4
338/99	4	0	+	I	W	4
342/99	6	0	+	I	W	6
343/99	6	0	+	I	W	6
351/99	8	0	+	I	W	8
357/99	7	6	+	I	W	1
368/99	12	11	+	I	W	1
373/99	4	0	+	I	W	4

AN	LL	LvO	GFAP	Umgeb	Halbj	KZ
375/99	7	5	-	I	W	2
377/99	3	0	+	I	W	3
404/99	17	15	-	I	W	2
410/99	6	4	+	I	W	2
411/99	21	19	-	I	W	2
412/99	4	2	+	I	W	2
413/99	4	3	+	I	W	1
420/99	4	0	+	I	W	4
3/00	2	0	+	I	W	2
5/00	3	0	+	I	W	3
6/00	4	0	+	A	W	4
13/00	5	0	+	I	W	5
18/00	4	0	+	I	W	4
19/00	21	2	-	I	W	19
21/00	5	0	+	I	W	5
23/00	2	0	+	I	W	2
28/00	4	0	+	I	W	4
31/00	2	0	+	I	W	2
34/00	1	0	+	I	W	1
36/00	3	0	+	I	W	3
37/00	1	0	+	I	W	1
38/00	1	0	+	I	W	1
39/00	3	2	+	A	W	1
41/00	4	0	+	I	W	4
42/00	5	0	+	I	W	5
44/00	1	0	+	A	W	1
45/00	3	0	+	I	W	3
52/00	2	0	+	A	W	2
60/00	5	0	+	A	W	5
66/00	5	0	+	I	W	5
68/00	2	0	+	I	W	2
71/00	2	0	+	I	W	2
73/00	1	0	+	A	W	1
81/00	4	0	+	A	W	4
84/00	1	0	+	I	W	1
86/00	4	0	+	I	W	4
87/00	1	0	+	I	W	1
89/00	1	0	+	I	W	1
96/00	1	0	+	I	W	1
100/00	1	0	+	A	W	1
104/00	3	2	+	I	W	1
106/00	2	0	+	I	W	2
108/00	7	5	+	I	W	2
110/00	4	0	+	I	W	4
117/00	3	0	+	I	W	3
127/00	5	0	+	I	W	5
135/00	1	0	+	I	S	1
138/00	8	0	+	I	W	8
141/00	2	0	+	I	S	2
146/00	5	4	+	I	S	1
151/00	7	0	+	A	S	7
165/00	5	3	+	I	S	2
169/00	8	7	+	A	S	1
194/00	12	11	-	A	S	1

AN	LL	LvO	GFAP	Umgeb	Halbj	KZ
195/00	6	0	-	A	S	6
200/00	5	4	+	I	S	1
201/00	9	0	+	I	S	9
211/00	6	1	+	I	S	5
239/00	5	0	+	I	S	5
244/00	13	11	-	A	S	2
247/00	5	3	+	I	S	2
249/00	2	0	+	I	S	2
296/00	7	0	+	I	S	7
302/00	3	0	+	I	S	3
303/00	3	0	+	I	S	3
306/00	4	0	+	I	S	4
314/00	5	0	+	I	S	5
318/00	4	0	+	I	S	4
320/00	4	0	+	I	S	4
328/00	5	0	+	I	S	5
340/00	3	0	+	I	S	3
345/00	6	5	-	I	S	1
358/00	1	0	+	A	W	1
374/00	4	0	+	I	W	4
386/00	5	3	+	I	W	2
395/00	4	1	+	I	W	3
404/00	3	0	+	I	W	3
407/00	1	0	+	I	W	1
408/00	3	0	+	A	W	3
410/00	5	0	+	I	W	5
415/00	3	0	+	I	W	3
427/00	4	0	+	I	W	4
436/00	1	0	+	A	W	1
439/00	1	0	+	I	W	1
440/00	2	0	+	A	W	2
442/00	2	0	+	I	W	2
447/00	12	11	+	A	W	1
13/01	5	0	+	I	W	5
14/01	6	5	+	I	W	1
34/01	7	0	+	I	W	7
38/01	4	0	+	I	W	4
47/01	4	0	+	I	W	4
50/01	4	0	+	A	W	4
60/01	4	0	+	A	W	4
67/01	4	0	+	I	W	4
85/01	4	0	+	A	W	4
102/01	4	0	+	I	W	4
107/01	3	0	+	I	W	3
128/01	5	0	+	I	W	5
131/01	9	0	+	I	W	9
135/01	10	0	-	I	W	10
140/01	4	3	+	I	W	1
141/01	4	3	+	I	W	1
157/01	5	0	+	I	W	5
163/01	4	1	+	I	W	3
169/01	6	4	+	I	W	2
177/01	6	0	+	I	W	6
187/01	7	4	+	I	W	3

AN	LL	LvO	GFAP	Umgeb	Halbj	KZ
192/01	8	0	+	I	W	8
197/01	5	0	+	I	S	5
199/01	3	0	+	I	S	3
209/01	1	0	+	A	S	1
212/01	4	0	+	I	S	4
213/01	3	1	+	A	S	2
215/01	6	4	+	I	S	2
217/01	1	0	+	I	S	1
220/01	2	0	+	I	S	2
222/01	5	4	-	I	S	1
231/01	6	2	+	I	S	4
232/01	13	0	+	I	S	13
233/01	3	0	+	A	S	3
240/01	5	3	-	I	S	2
245/01	1	0	+	I	S	1
247/01	2	0	+	A	S	2
249/01	7	0	+	I	S	7
251/01	2	0	+	I	S	2
255/01	2	0	+	I	S	2
256/01	8	0	+	I	S	8
257/01	4	0	+	I	S	4
258/01	1	0	+	I	S	1
260/01	2	0	+	I	S	2
262/01	1	0	+	I	S	1
263/01	3	0	+	I	S	3
265/01	3	0	+	I	S	3
271/01	4	0	+	I	S	4
272/01	3	0	+	I	S	3
278/01	1	0	+	A	S	1
281/01	2	0	+	A	S	2
289/01	3	0	+	I	S	3
290/01	1	0	+	A	S	1
291/01	1	0	+	A	S	1
293/01	2	0	+	I	S	2
296/01	5	4	+	I	S	1
299/01	10	9	-	I	S	1
300/01	2	0	+	I	S	2
301/01	3	1	+	A	S	2
307/01	2	0	+	I	S	2
310/01	2	0	+	I	S	2
311/01	6	4	-	I	S	2
312/01	5	0	+	I	S	5
322/01	6	6	+	I	S	0
331/01	1	0	+	I	S	1
333/01	3	3	+	I	S	0
334/01	9	0	-	I	S	9
335/01	1	0	+	A	S	1
336/01	11	10	-	I	S	1
338/01	3	0	+	I	S	3
339/01	2	0	+	I	S	2
340/01	4	0	+	I	S	4
341/01	2	0	+	I	S	2
342/01	2	0	+	A	S	2
350/01	5	0	+	I	S	5

AN	LL	LvO	GFAP	Umgeb	Halbj	KZ
351/01	2	0	+	I	S	2
353/01	1	0	+	A	S	1
356/01	5	0	+	I	S	5
361/01	1	0	+	I	S	1
363/01	3	0	+	A	S	3
366/01	1	0	+	I	S	1
368/01	2	0	+	I	S	2
369/01	1	0	+	I	S	1
375/01	1	0	+	I	S	1
376/01	3	0	+	I	S	3
379/01	1	0	+	I	S	1
383/01	2	0	+	I	S	2
385/01	1	0	+	A	S	1
386/01	2	0	+	I	S	2
387/01	3	0	+	A	S	3
390/01	2	0	+	A	S	2
395/01	1	0	+	I	S	1
396/01	2	0	+	I	S	2
397/01	2	0	+	I	S	2
398/01	4	0	+	I	S	4
399/01	6	0	+	I	S	6
400/01	1	0	+	I	S	1
406/01	1	0	+	I	S	1
408/01	10	7	-	I	S	3
409/01	3	0	+	I	W	3
410/01	3	0	+	I	S	3
411/01	1	0	+	I	W	1
413/01	4	0	+	I	W	4
414/01	2	0	+	I	W	2
415/01	2	0	+	I	W	2
417/01	4	1	+	I	W	3
419/01	6	5	-	I	W	1
421/01	4	0	+	I	W	4
423/01	6	5	-	I	W	1
444/01	4	0	+	I	W	4
458/01	4	0	+	I	W	4
468/01	11	10	-	I	W	1
482/01	4	0	+	A	W	4
493/01	9	0	+	I	W	9
500/01	3	0	+	I	W	3
513/01	5	4	+	A	W	1
516/01	12	11	-	I	W	1
517/01	7	0	+	I	W	7
524/01	3	0	+	I	W	3
526/01	15	12	-	I	W	3
2/02	10	0	+	I	W	10

AN	LL	LvO	GFAP	Umgeb	Halbj	KZ
3/02	4	0	+	I	W	4
4/02	7	0	+	I	W	7
5/02	4	0	+	I	W	4
9/02	6	0	+	I	W	6
10/02	4	0	+	I	W	4
14/02	3	0	+	I	W	3
17/02	8	0	+	I	W	8
20/02	6	0	+	I	W	6
23/02	3	0	+	A	W	3
24/02	4	0	+	I	W	4
25/02	21	16	-	I	W	5
27/02	13	10	+	I	W	3
28/02	12	10	+	I	W	2
29/02	7	6	+	A	W	1
34/02	9	0	+	I	W	9
35/02	7	6	+	I	W	1
49/02	4	0	+	I	W	4
53/02	6	0	+	I	W	6
54/02	10	0	+	I	W	10
71/02	6	5	+	I	W	1
84/02	4	0	+	I	W	4
101/02	11	0	+	I	W	11
122/02	1	0	+	A	W	1
139/02	4	0	+	I	W	4
159/02	4	0	+	I	W	4
163/02	11	0	+	I	W	11
193/02	5	2	-	A	S	3
201/02	17	15	-	I	S	2
226/02	5	4	-	I	S	1
237/02	4	0	+	I	S	4
239/02	4	0	+	I	S	4
245/02	6	0	+	I	S	6
273/02	10	0	+	I	S	10
296/02	5	4	+	I	S	1
302/02	5	0	+	I	S	5
311/02	7	6	+	I	S	1
322/02	5	0	+	I	S	5
332/02	5	0	+	I	S	5
339/02	10	0	+	I	S	10
342/02	6	1	+	I	S	5
373/02	5	2	+	I	S	3
385/02	5	4	+	A	S	1
390/02	6	5	+	A	S	1
412/02	6	5	-	I	S	1

**Anhang 3:** Alle theoretisch denkbaren Kombinationen von Testergebnissen, bei Anwendung aller immunhistochemischen Testmethoden. Zu den möglichen Ergebniskombinationen kann die entsprechende Eingrenzung der Leichenliegezeit abgelesen werden. Positive (+) und negative (-) immunhistochemische Färbeergebnisse der Proteine; Angabe der möglichen Liegetage bei entsprechender Ergebniskombination (7,8,9,10 bedeutet, dass die postmortale Liegezeit auf den 7. bis einschließlich 10. Tag eingegrenzt werden kann); / steht für „Liegetag nicht möglich“.

GFAP	Somatostatin	Cystatin C	Calcitonin	Thyroglobulin	Glucagon	Insulin	mögliche Liegezeit p. m. [Tage]																
							1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/	
+	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
+	+	+	+	+	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
+	+	+	+	+	-	+	/	/	/	/	/	/	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/	/
+	+	+	+	+	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
+	+	+	+	-	+	+	/	/	/	/	/	6	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/	/
+	+	+	+	-	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
+	+	+	+	-	-	+	/	/	/	/	/	/	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/	/
+	+	+	+	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
+	+	+	-	+	+	+	/	/	/	/	5	6	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/	/
+	+	+	-	+	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
+	+	+	-	+	-	+	/	/	/	/	/	/	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/	/
+	+	+	-	+	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
+	+	+	-	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
+	+	-	+	+	+	+	/	/	3	4	5	6	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/	/
+	+	-	+	+	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
+	+	-	+	+	-	+	/	/	/	/	/	/	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/	/
+	+	-	+	+	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
+	+	-	+	-	+	+	/	/	/	/	/	/	6	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/
+	+	-	+	-	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
+	+	-	+	-	-	+	/	/	/	/	/	/	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/	/
+	+	-	+	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
+	+	-	-	+	+	+	/	/	/	/	5	6	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/	/
+	+	-	-	+	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
+	+	-	-	+	-	+	/	/	/	/	/	/	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/	/
+	+	-	-	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
+	+	-	-	-	+	+	/	/	/	/	/	6	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/	/
+	+	-	-	-	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
+	+	-	-	-	-	+	/	/	/	/	/	/	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/	/



GFAP	Somatostatin	Cystatin C	Calcitonin	Thyroglobulin	Glucagon	Insulin	mögliche Liegezeit p. m. [Tage]															
							1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
-	+	+	-	-	+	+	/	/	/	/	/	6	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/
-	+	+	-	-	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
-	+	+	-	-	-	+	/	/	/	/	/	/	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/
-	+	+	-	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
-	+	-	+	+	+	+	/	/	/	4	5	6	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/
-	+	-	+	+	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
-	+	-	+	+	-	+	/	/	/	/	/	/	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/
-	+	-	+	+	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
-	+	-	+	-	+	+	/	/	/	/	/	6	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/
-	+	-	+	-	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
-	+	-	+	-	-	+	/	/	/	/	/	/	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/
-	+	-	+	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
-	+	-	-	+	+	+	/	/	/	/	5	6	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/
-	+	-	-	+	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
-	+	-	-	+	-	+	/	/	/	/	/	/	7	8	9	10	/	/	/	/	/	/
-	+	-	-	+	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
-	+	-	+	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
-	-	+	+	+	+	+	/	/	/	4	5	6	7	8	9	10	11	12	/	/	/	/
-	-	+	+	+	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
-	-	+	+	+	-	+	/	/	/	/	/	/	7	8	9	10	11	12	/	/	/	/
-	-	+	+	-	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
-	-	+	+	-	-	+	/	/	/	/	/	/	7	8	9	10	11	12	/	/	/	/
-	-	+	+	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
-	-	+	-	+	+	+	/	/	/	/	5	6	7	8	9	10	11	12	/	/	/	/
-	-	+	-	+	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
-	-	+	-	+	-	+	/	/	/	/	/	/	7	8	9	10	11	12	/	/	/	/
-	-	+	-	+	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
-	-	+	-	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
-	-	-	+	+	+	+	/	/	/	4	5	6	7	8	9	10	11	12	/	/	/	/
-	-	-	+	+	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
-	-	-	+	+	-	+	/	/	/	/	/	/	7	8	9	10	11	12	/	/	/	/
-	-	-	+	+	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
-	-	-	+	-	+	+	/	/	/	/	/	6	7	8	9	10	11	12	/	/	/	/
-	-	-	+	-	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
-	-	-	+	-	-	+	/	/	/	/	/	7	8	9	10	11	12	/	/	/	/	/
-	-	-	-	+	+	+	/	/	/	/	5	6	7	8	9	10	11	12	/	/	/	/



## 7.1 Abkürzungen

GFAP – Glial Fibrillary Acidic Protein

LL – Liegezeit

LvO – Liegezeit vor Ort (Todeszeitpunkt bis zum Auffinden der Leiche)

Kühlzeit (vom Auffinden der Leiche bis zur Obduktion)

p. m. – post mortem

OR – Odds Ratios

LQ – Likelihood Quotient

## 8 Danksagung

Dank allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Namentlich nennen möchte ich an dieser Stelle meinen Betreuer Herrn Dr. Frank Wehner, meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Heinz-Dieter Wehner, für die Betreuung im Labor mit vielen wertvollen Hilfestellungen Frau Rita Rilling, für Unterstützung auf dem Gebiet der Entomologie Herrn Dr. Martin M. Schulz und für die eingehende Betreuung bei der statistischen Auswertung Herrn PD Dr. Martin Eichner (Institut für Medizinische Biometrie).

Ganz persönlicher und herzlicher Dank gilt Frau Dr. Joti Sitzmann und Herrn Prof. Dr. Ferdinand Sitzmann, Herrn Dr. Stephan Becker und meiner Mutter Rosemarie Steinriede für ihre aufmunternde Unterstützung.

## 9 Lebenslauf

Name: Anja Steinriede

Geburtstag: 04.05.1979

Geburtsort: Stuttgart

Eltern: Rainer Steinriede und Rosemarie Steinriede, geb. Rönz

Staatsangehörigkeit: deutsch

Konfession: evangelisch

Schulbildung an der Freien Waldorfschule am Kräherwald von 1985 bis 1998.

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife / Abitur (26.06.1998).

Ausbildung zur Arzthelferin (2. Lehrjahr) vom 01.09.1998 bis 31.09.1999 in der dermatologischen Praxis Dr. med. Jörg Zimmermann, 70839 Gerlingen.

Hochschulstudium der Zahnheilkunde an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen ab WS 1999/00.

Naturwissenschaftliche Vorprüfung: 01.10.2000.

Zahnärztliche Vorprüfung: 01.10.2002.

Zahnärztliche Prüfung: 01.06.2005

Zahnärztliche Approbation: 13.06.2005

Posterpräsentation: „Delimitation of the time of death by immunohistochemical detection of GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) in Astrocytes“; 30.03.2004 – 02.04.2004; 3<sup>rd</sup> International Congress on Legal Medicine in Damascus